

Cristalização avançada de moléculas biologicamente relevantes

Cecília Fernanda de Sá Ferreira Rodrigues

Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química e Biológica
pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Esta tese foi elaborada sob orientação
Doutor Fernando Alberto Nogueira da Rocha, Departamento de Engenharia Química,
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

e coorientação

Doutor Pedro Miguel Martins, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Doutora Ana Margarida Damas, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia
Departamento de Engenharia Química
Faculdade de Engenharia
Universidade do Porto

dezembro, 2016

Resumo

A cristalização de proteínas é um passo determinante no estudo da estrutura e função de moléculas de interesse biológico usando cristalografia de raios-X. Neste trabalho investigou-se os mecanismos fundamentais de nucleação, crescimento e dissolução de cristais de proteína.

O sistema em estudo foi a lisozima, proveniente de clara de ovo de galinha, em solução aquosa e na presença de contaminantes naturais da proteína. As experiências laboratoriais de cristalização de lisozima foram efetuadas numa célula de crescimento encamisada e monitorizadas por microscopia ótica com captação de imagens em tempo real, que permitiram acompanhar a evolução do sistema ao longo do tempo.

Neste trabalho investigou-se a influência de impurezas na cristalização de proteínas, nomeadamente o efeito destas nos mecanismos de crescimento cristalino em solução. Com o objetivo de analisar a influência de diferentes velocidades de aumento/diminuição de sobressaturação ao longo do crescimento do cristal na presença de impurezas, foram realizadas experiências com variação da temperatura a diferentes perfis aquecimento/arrefecimento e arrefecimento/aquecimento. Os resultados obtidos revelaram a existência de fenómenos de histerese nas velocidades de crescimento cristalino. O crescimento cristalino de lisozima pode ser acelerado, retardado, ou até mesmo suprimido alterando a velocidade de variação de sobressaturação. Assim, com base nestes resultados, a velocidade de variação de sobressaturação foi definida como uma nova variável que influencia o crescimento cristalino relativamente às condições de estado estacionário.

Os fenómenos de histerese foram interpretados à luz de um novo modelo de adsorção de impurezas, em estado transiente, em locais ativos para crescimento, sensível à direção e velocidade de variação de sobressaturação (CAMKOD). O modelo CAMKOD, fundamentado nos modelos de adsorção competitiva em estado estacionário (CAM) e não estacionário (CAMUS), sugere que podem ser descritos dois tipos de histerese com base na variação de densidades de locais ativos com a sobressaturação.

Nos casos em que a densidade de locais ativos é aproximadamente constante, a diminuição ou o aumento da sobressaturação induz, respetivamente, um efeito promotor ou inibidor do crescimento relativamente às condições de equilíbrio. Por outro lado, quando a densidade é variável, pequenas variações na sobressaturação podem conduzir a alterações abruptas nas velocidades de crescimento do cristal. O modelo proposto proporcionou um melhor entendimento sobre o mecanismo pelo qual a variação de velocidade de sobressaturação impossibilita o restabelecimento do equilíbrio de adsorção.

Neste trabalho foram também realizadas experiências compostas por uma fase de nucleação/crescimento seguida de dissolução, tendo em vista uma melhor compreensão destes dois fenómenos. Neste caso, o sistema era arrefecido até atingir uma sobressaturação elevada, e após a nucleação, o sistema era aquecido de modo a promover a dissolução completa dos cristais formados. Este processo era repetido sucessivamente. Desta forma, pretendeu-se determinar várias cinéticas de nucleação e dissolução num só ensaio experimental. Os resultados obtidos sugerem que a solução de lisozima, presente em pequenos volumes e sujeita a sucessivos ciclos de temperatura, vai perdendo progressivamente, de ciclo para ciclo, atividade enzimática. Tal indicia alterações estruturais da proteína, que também se refletiram no abrandamento, e posterior cessação da dissolução dos cristais em solução. Para complementar este estudo, amostras de solução de lisozima foram analisadas por Dispersão Dinâmica de Luz. Os resultados obtidos evidenciaram percursos de agregação de proteína alternativos à formação de cristais, como sejam a formação de pequenos agregados solúveis chamados oligómeros ou a nucleação e crescimento de agregados metastáveis com valores de raio hidrodinâmico acima de 100 nm. Estas experiências revelam novos aspetos críticos necessários à produção de cristais de proteína, o que deverá contribuir para o desenvolvimento de métodos de cristalização de proteínas mais eficientes.

Palavras-chaves: Cristalização, Crescimento cristalino, Nucleação, Dissolução, Impurezas, Sobressaturação, Adsorção competitiva, Histerese.

Abstract

In this work, the mechanisms of nucleation, growth and dissolution of protein crystals were investigated from a fundamental point of view. Protein crystallization is a crucial step for the study of structure and function of biological molecules using X-ray crystallography.

The system studied was lysozyme, from egg-white, in aqueous solution in the presence of the natural protein contaminants. Laboratory experiments of lysozyme crystallization were conducted in a growth jacketed cell and monitored by optical microscopy with real-time imaging, which allowed following the evolution of the system over time.

In order to study the influence of different rates of increase/decrease of supersaturation along the crystal growth in the presence of impurities, experiments were carried out for different temperature profiles at heating/cooling and cooling/heating cycles. A phenomenon called crystal growth rate hysteresis was identified. It was showed that the crystal growth of lysozyme can be accelerated, retarded, or even suppressed by altering the rate of supersaturation variation. In this work, the rate of supersaturation variation was introduced as a new variable that can dramatically influence the crystal growth relatively to steady-state conditions.

A new model based on competitive adsorption steady state (CAM) and non-stationary (CAMUS) models was developed to explain the hysteresis phenomenon. This model (CAMKOD) showed that the transient adsorption of impurities onto newly formed active sites for growth (or kinks) is sensitive to the direction and rate of supersaturation variation. Two types of crystal growth rate hysteresis results were described according to the variation of kink density with supersaturation. For nearly constant density, decreasing or increasing supersaturation induce, respectively, growth promoting or inhibiting effects relatively to equilibrium conditions. For variable kink

density, slight changes in the supersaturation level may induce abrupt variations in the crystal growth rate.

Experiments composed by a nucleation/growth phase followed by dissolution phase were carried out in order to better understand these phenomena. To promote nucleation, the system was cooled down to achieve high supersaturation levels, and then the system was warmed up to induce the complete dissolution of the generated crystals. This process was repeated successively. Thus, it was possible to determine several nucleation and dissolution kinetics in only one experimental test. The results suggest that lysozyme solution, present in small volumes and subject to successive temperature cycles, progressively loses enzyme activity, from cycle to cycle. This suggests conformational changes in the protein molecule provoking the crystal dissolution rates to gradually decrease until complete cessation.. To complete this study, lysozyme samples were analyzed by Dynamic Light Scattering. The results showed alternative aggregation pathways that do not involve the formation of protein crystals such as the formation of small soluble aggregates called oligomers or the nucleation and growth of metastable aggregates with hydrodynamic radii above 100 nm.. These experiments reveal new critical aspects needed to produce protein crystals, which should contribute to the development of more efficient methods of protein crystallization.

Keywords: Crystallization, Crystal growth, Nucleation, Dissolution, Impurities, Supersaturation, Competitive adsorption, Hysteresis

Este trabalho foi suportado financeiramente pelo:

Projeto UID/EQU/00511/2013-LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia-EQU/00511)

Fundos FEDER através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização - COMPETE2020

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT); Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/74174/2010).

Preceitos Legais

De acordo com o Decreto-Lei n.º 115/2013, publicado no Diário da República, 1ª série nº 151, de 7 de Agosto de 2013, foram utilizados os resultados dos seguintes artigos:

Running away from Thermodynamics To Promote or Inhibit Crystal Growth **Cecília Ferreira**, Fernando Rocha, Ana M. Damas, Pedro M. Martins; Crystal Growth & Design, November 2011, 12, 40–43

On growth rate hysteresis and catastrophic crystal growth **Cecília Ferreira**, Fernando Rocha, Ana M. Damas, Pedro M. Martins; Journal of Crystal Growth, January 2013, 368, 47–55

The Finding of Nondissolving Lysozyme Crystals and Its Significance for the Study of Hard-to-Crystallize Biological Macromolecules **Cecília Ferreira**, Fernando Rocha, Ana M. Damas, Pedro M. Martins; Crystal Growth & Design, July 2016, 16, 4285–4291

The nucleation of protein crystals as a race against time with on- and off-pathways **Cecília Ferreira**, Pablo Taboada, Fernando Rocha, Ana M. Damas, Pedro M. Martins. Submetido, pendente de aceitação.

Outras publicações:

“Small temperature oscillations promote protein crystallization” **Cecília Ferreira**, Rosa Crespo, Pedro M. Martins, Luís Gales, Fernando Rocha, Ana M. Damas; CrystEngComm, Feb. 2011, xx, 1-7

De acordo com o Decreto-Lei, o autor desta tese afirma que interveio no desenvolvimento e desempenho do trabalho experimental, bem como na interpretação e redação dos resultados publicados sob o nome de Cecília Ferreira.

ao Zé Manel

à minha mãe

ao meu mano

“Feliz o homem que encontra sabedoria
E o homem que obtém discernimento;
Ganhar sabedoria é melhor do que ganhar prata,
E obtê-la é melhor do que obter ouro.
Ela é mais preciosa do que corais;
Nada do que desejas se pode comparar a ela.”

Provérbios 3:13-15, Bíblia Sagrada

Agradecimentos

A elaboração da minha tese de doutoramento foi o maior desafio académico que vivenciei. Os últimos anos de trabalho de investigação culminaram neste manuscrito, que espelha não só o meu desempenho, mas também o apoio de pessoas importantes que contribuíram direta ou indiretamente para este propósito.

Em primeiro lugar, o meu sincero agradecimento ao meu orientador Professor Fernando Rocha pela sua orientação, disponibilidade, dedicação e motivação. As suas qualidades como ser humano, que o distinguem, contribuíram para o bom desenvolvimento desta tese.

Ao meu co-orientador Doutor Pedro Martins agradeço a sua preciosa ajuda, os bons conselhos, os conhecimentos científicos partilhados, e acima de tudo, os valores que me transmitiu.

À Professora Ana Damas agradeço pela sua cooperação e disponibilidade.

Ao Doutor Pablo Taborda gostaria de agradecer a sua colaboração e as condições de trabalho que ofereceu no Departamento de Física de la Materia Condensada, da Universidade de Santiago de Compostela

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia agradeço a Bolsa de Doutoramento que me concedeu, sem a qual este trabalho não seria possível. Os meus agradecimentos ao LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia) que me proporcionou excelentes condições de trabalho no Departamento de Engenharia Química da FEUP.

O meu sincero obrigado aos meus parceiros de trabalho: Filipa, Antónia, Patrícia, Ioana, Mohammad, Berta e António. Obrigada pela vossa paciência e palavras de encorajamento transmitidas no momento apropriado. Guardo-vos no meu coração.

Agradeço o apoio indispensável da minha família e dos meus amigos. Em particular, da minha mãe e do meu irmão por serem bons ouvintes. Do meu marido, Zé

Manel, por toda a compreensão e amor demonstrado. E por último, agradeço ao meu pai que infelizmente não teve tempo para ver a filha a crescer. Se estivesse connosco certamente estaria muito honrado por presenciar este momento da minha vida, assim como muitos outros que perdeu.

Este trabalho foi financiado por: Projeto UID/EQU/00511/2013-LEPABE (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, EQU/0511) pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (COMPETE2020) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.; Bolsa FCTSFRH/BD/74174/2010.

Conteúdo

Nomenclatura.....	i
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xv
Motivação e objetivos.....	1
Organização da tese	5
1. Teoria de cristalização.....	7
1.1 Cristalização de proteínas	7
1.2 Nucleação.....	10
1.2.1 Teoria clássica da nucleação	12
1.2.2 Velocidade de nucleação	15
1.2.3 Nucleação de proteínas.....	17
1.3 Crescimento cristalino	20
1.3.1 Mecanismo de crescimento baseado na teoria de adsorção em camadas.....	21
1.3.2 Crescimento cristalino em proteínas	24
1.4 Efeito das impurezas na cinética de cristalização	27
1.4.1 Modelos cinéticos de adsorção de impurezas em estado estacionário	29
1.4.2 Modelos cinéticos de adsorção de impurezas em estado não estacionário ..	36
1.5 Fenómeno de histerese no crescimento cristalino.....	39
1.6 Dissolução.....	42

1.7	Variáveis que afetam a solubilidade das proteínas	45
1.7.1	O efeito de iões.....	45
1.7.2	O efeito da temperatura	47
1.8	Mecanismo de transporte em proteínas	48
2	Métodos de cristalização de proteínas.....	51
2.1	Batch	52
2.2	Difusão de vapor.....	54
2.3	Diálise	56
2.4	Difusão líquido/líquido.....	57
2.5	Referências bibliográficas.....	59
3	Técnicas e instalações experimentais	69
3.1	Instalações experimentais	69
3.2	Técnicas experimentais.....	71
3.2.1	Produção de cristais pelo método difusão de vapor	71
3.2.2	Caraterização de cristais por análise de imagem.....	72
3.2.3	Caraterização de solução de proteína por DLS	74
3.2.4	Medição da atividade enzimática de soluções de HEWL	76
3.3	Referências bibliográficas.....	77
Parte I.....		79
	Dissolução de Cristais de Lisozima.....	79
4	Dissolução	81

4.1	Introdução	81
4.2	Método Experimental	82
4.3	Resultados obtidos	83
4.4	Discussão	88
4.5	Conclusões	95
4.6	Referências bibliográficas.....	95
Parte II.		101
Crescimento cristalino		101
5	Efeito das impurezas na cinética de crescimento em estado não estacionário.....	103
5.1	Introdução	103
5.2	Método Experimental	108
5.3	Resultados e discussão	109
5.4	Conclusões	115
5.5	Referências bibliográficas.....	115
6	Fenômeno de histerese na velocidade de crescimento e crescimento cristalino catastrófico.....	119
6.1	Introdução	119
6.2	Método Experimental	125
6.3	Resultados e discussão	127
6.3.1	Densidade de <i>kinks</i> independente de σ ($\phi < 0$).....	127
6.3.2	Densidade de <i>kinks</i> dependente de σ ($\phi > 0$).....	133
6.4	Conclusões	139

6.5	Referências bibliográficas.....	140
Parte III.	145
Nucleação	145
7	Nucleação.....	147
7.1	Introdução.....	147
7.2	Método experimental.....	150
7.3	Resultados e Discussão.....	152
7.3.1	Nucleação de cristais de HEWL acompanhada por microscopia ótica.....	152
7.3.2	Resultados de DLS indicam diferentes percursos de agregação.....	155
7.3.3	Percurso de oligomerização.....	157
7.3.4	O percurso de formação de aglomerados metastáveis.....	163
7.3.5	Possível mecanismo de cristalização intermitente.....	167
7.4	Conclusões.....	170
7.5	Referências bibliográficas.....	171
8	Conclusões.....	177
8.1	Apreciação geral do trabalho.....	177
8.2	Perspetivas para trabalho futuro.....	178
Anexo - A	181
	Derivação matemática do modelo de adsorção competitiva compreendendo a ocupação dinâmica de kink (CAMKOD).....	181
	Referências bibliográficas.....	184

Nomenclatura

Caracteres Romanos

A	Atividade enzimática de HEWL, de acordo com o Capítulo 4
A	Área de superfície do aglomerado, de acordo com o Capítulo 1
a_a	Atividade termodinâmica de HEWL ativa em solução
a_T	Atividade termodinâmica de HEWL total em solução
a_α	Atividade química em solução
a_β	Atividade química da fase sólida
b	Constante cinética da equação 5.10
c	Concentração de soluto
c^*	Solubilidade de soluto
c_i	Concentração de impurezas
c_{n-mer}	Concentração oligomérica
D	Coefficiente de difusão
d_f	Diâmetro fractal
d_m	Diâmetro molecular
E_i	Função integral exponencial, abordada no Anexo A
E_1	Função integral exponencial, abordada no Anexo A
g_0	Forma adimensional da velocidade de crescimento de uma face do cristal na ausência de impurezas
G	Velocidade de crescimento cristalino na presença de impurezas, abordada no Capítulo 5 e 6

G_0	Velocidade de crescimento cristalino na ausência de impurezas, abordada no Capítulo 5 e 6
G_e	Velocidade de crescimento cristalino em estado estacionário, abordada no Capítulo 5 e 6
G_2	Função de correlação temporal, no Capítulo 3.
g_2	Variação da intensidade da luz dispersa
I	Intensidade da luz dispersa
J	Velocidade de nucleação
k	Constante cinética da equação 5.10
k_0	Fator pré-exponencial
k_0	Constante de <i>salting-out</i>
k_B	Constante de Boltzmann
k_G	Constante de velocidade
k_i	Constante de <i>salting-in</i>
k_i	Constante de velocidade de ligação de impurezas
k_{-i}	Constante de velocidade de desprendimento de impurezas
k_R	Razão $ k_{-i}/R_\sigma $
K	Constante de Langmuir
K_i	Constante de Langmuir
k_j	Constante de velocidade de adsorção de cada espécie química
k_{-j}	Constante de velocidade de dessorção de cada espécie química
K_{n-2n}	Constantes de equilíbrio da reação de oligomerização
K'_1	Combinação das constantes de Langmuir K_i e K , e c_i (equação 9.5)

K_2	Combinação das constantes de Langmuir K_i e K , e c_i (equação 9.6)
K_1	Parâmetro definido como o produto $\beta_e K'_1$
l	Distância média entre impurezas adsorvidas
L	Distância média entre locais ativos
\bar{L}	Diâmetro equivalente do cristal
m	Declive da relação linear entre $\log \tau$ e $1/\log^2 S$ da equação 1.16
n	Número de moléculas de soluto em solução
n_{ad}	Número de locais de adsorção ocupados
n_{max}	Número de locais de adsorção disponíveis
n_i	Número de <i>kinks</i> ocupados por impureza
n_T	Número total de <i>kinks</i>
n_s	Densidade de moléculas de soluto adsorvidos à superfície
n_{se}	Densidade de moléculas de soluto adsorvidos à superfície em equilíbrio
q	Intensidade do vetor de dispersão
r	Raio de núcleos esféricos
R	Constante de gases
R_1	Raio hidrodinâmico do monómero de HEWL
R_2	Raio hidrodinâmico de aglomerados metaestáveis
R_D	Velocidade de dissolução do cristal, de acordo com o Capítulo 4
R_G	Velocidade de crescimento do cristal, de acordo com o Capítulo 4
R_h	Raio hidrodinâmico
$R_{\Delta T}$	Velocidade de variação linear da temperatura

R_σ	Velocidade de variação da sobressaturação
S	Sobressaturação definida como c/c^*
S^*	Sobressaturação crítica
t	Tempo
t_d	Tempo necessário para atingir uma distribuição estacionária de tamanhos de aglomerados pré-críticos
t_g	Tempo necessário para detecção experimental dos núcleos formados
t_n	Tempo necessário para a formação de um núcleo crítico
t_w	Tempo de espera para a nucleação
T	Temperatura
T_0	Temperatura inicial
T_e	Temperatura de saturação
T_m	Ponto médio de desnaturação
x_a	Fração de moléculas de HEWL que mantêm a sua estrutura nativa

Caracteres gregos

α	Fator de eficácia da impureza dada pela equação 1.27
β	Fator de eficácia da impureza dada pela equação 1.30
β_e	Fator de eficácia da impureza em equilíbrio
γ	Tensão superficial
δ	Espessura da camada limite de difusão
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs total

ΔG_s	Variação da energia livre de Gibbs de superfície
ΔG_v	Variação da energia livre de Gibbs de volume
ΔG^*	Variação da energia livre de Gibbs crítica
ΔH_{cris}	Entalpia de cristalização
ΔL	Variação da normal à face {101} do cristal HEWL
ΔL_e	Variação da normal à face {101} do cristal HEWL em estado estacionário
ΔT	Sobresaturação
ΔT_c	Sobresaturação crítica
ΔT_0	Sobresaturação máxima
ΔT_s	Sobresaturação mínima
ε	Constante relacionada com os fatores geométricos e propriedades do núcleo 2D
η	Viscosidade do solvente
θ	Ângulo de dispersão de luz
θ	Fração de locais disponíveis para adsorção
θ_l	Fração de locais ativos ocupados por impurezas em estado não estacionário
θ_s	Fração da superfície ocupada por impurezas em adsorção competitiva
θ_e	Fração de locais ativos ocupados em equilíbrio
θ_0	Fração de locais ativos ocupados no momento inicial
μ_α	Potencial químico em solução
μ_β	Potencial químico da fase sólida
ν	Volume molar
ν	Velocidade do degrau na presença de impurezas

v_p	Velocidade de avanço de degrau
v_0	Velocidade do degrau num sistema puro
v_∞	Movimento unidirecional de um degrau
ρ	Raio da curvatura do degrau
ρ_c	Raio crítico para nucleação bidimensional
σ	Sobressaturação definida como $c/c^* - 1$
τ	Tempo de indução
τ	Constante de tempo de adsorção
τ	Tempo de correlação
ϕ	Parâmetro da equação 5.8
Ω	Volume específico

Índices e Expoentes

0	Estado puro
0	Estado inicial
*	Saturação
*	Valor crítico
<i>cris</i>	Cristalização
<i>e</i>	Equilíbrio
<i>D</i>	Dissolução
<i>G</i>	Crescimento
<i>i</i>	Impureza

j	Espécie química
+	Aumento de σ
–	Diminuição de σ

Acrónimos

CAM	Modelo de adsorção competitiva
CAMUS	Modelo de adsorção competitiva em estado não estacionário
CAMKOD	Modelo de adsorção competitiva em estado transiente com variações na densidade de <i>kinks</i>
CCG	Crescimento cristalino catastrófico
GRH	Histerese nas velocidades de crescimento
HEWL	Lisozima de clara de ovo de galinha

Lista de Figuras

Figura 1.1: A) Cristais tetragonais de lisozima de clara de ovo de galinha. B) Estrutura de molécula de lisozima determinada por difração em raio-X.....	8
Figura 1.2: Classificação do processo de nucleação baseado no mecanismo de nucleação do cristal.	11
Figura 1.3: Variação da barreira de ativação em função da sobressaturação (García-Ruiz, 2003).	14
Figura 1.4: Caminho provável de nucleação de proteínas. Os passos I a IV são descritos no corpo de texto (McPherson & Kuznetsov, 2014).	18
Figura 1.5: A) Velocidade de nucleação em função da sobressaturação. B) Diagrama de solubilidade apresentando as diferentes fases (García-Ruiz, 2003).	19
Figura 1.6: Crescimento cristalino de uma superfície sem imperfeições: A) migração direcionada para locais preferenciais; B) camada completa; C) nucleação à superfície (Mullin, 2001).	21
Figura 1.7: Modelo de Kossel de um crescimento da superfície do cristal. (A) superfícies planas. (B) degraus, (C) <i>kinks</i> , (D) unidades de crescimentos adsorvidas à superfície, (E) espaços vazios nas arestas e (F) espaços vazios na superfície (Mullin, 2001).	22
Figura 1.8: Desenvolvimento de um crescimento em espiral iniciado de uma dislocação em parafuso (Mullin, 2001).	23
Figura 1.9: Representação esquemática do crescimento tangencial e normal à face (McPherson & Kuznetsov, 2014).	24
Figura 1.10: Micrográfico de força atômica de cristais de lisozima em crescimento por diferentes mecanismos. A) Nucleação bidimensional. B) Dislocação em parafuso. A barra de escala em μm (Durbin & Feher, 1996).	25

Figura 1.11: Representação esquemática dos locais de adsorção de impurezas: A) <i>kinks</i> , B) no degrau e C) no terraço da face cristalina (Sangwal, 2007).....	28
Figura 1.12: Modelo de adsorção de impurezas (Kubota, 2001a).....	30
Figura 1.13: Relação teórica entre a velocidade relativa do degrau v/v_0 e a forma adimensional da concentração de impureza para diferentes valores de α	33
Figura 1.14: O perfil 1 (P1) corresponde ao comportamento convencional de adsorção em estado não estacionário, no qual a velocidade da adsorção de impurezas diminui com o tempo. Os perfis 2 e 3 (P2 e P3) não são explicados pelos mecanismos <i>pinning</i>	39
Figura 1.15: Variação do sobreaquecimento ao longo do ensaio experimental (Kubota et al., 2003)	41
Figura 1.18: Imagem de um cristal de sacarose apresentando depressões na sua superfície no início da dissolução (Mullin, 2001).	44
Figura 1.19: Fenómeno de <i>salting-in</i> . A) Na ausência de íons dissolvidos em solução, as moléculas de proteína vão estabelecer ligações por atração eletrostática entre os grupos carregados. B) Os íons blindam a interação eletrostática entre as macromoléculas, aumentando a solubilidade.	46
Figura 1.20 Contribuição dos efeitos eletrostático e hidrofóbico sobre a solubilidade c^* , normalizada em relação à solubilidade em água pura c_0^* (Lee & Kim, 2003).	47
Figura 2.1: Desenho esquemático de um diagrama de fases baseado em dois dos parâmetros mais vulgarmente usados em cristalização de proteínas: as concentrações de proteína e de precipitante (Chayen, 1998).....	52
Figura 2.2: Cristalização em <i>batch</i> e <i>microbatch</i> (Weber, 1997)	53
Figura 2.3: Cristalização por difusão de vapor (Weber, 1997).	55
Figura 2.4: Cristalização por diálise (Weber, 1997).....	57
Figura 2.5: Métodos de cristalização que separam condições de nucleação e de crescimento dentro de um único reservatório (Weber, 1997).	58

Figura 3.1: Instalação experimental composta por (A) estereomicroscópio calibrado <i>Nikon SMZ1500</i> equipado com uma camara digital <i>Nikon DS-Ri1e</i> o programa <i>Nis-Elements BR 3.1</i> , (B) célula de crescimento e (C) banho termostático <i>Huber ministat 125-cc-NR</i>	69
Figura 3.2: Representação esquemática da instalação experimental.....	70
Figura 3.3: Dimensões da célula de crescimento encamisada.....	70
Figura 3.4: Esquema do método de cristalização difusão de vapor recorrendo à técnica de <i>hanging drop</i>	71
Figura 3.5: Sequência das operações efetuadas às imagens antes das medições dos parâmetros bidimensionais. Esta imagem foi capturada no início de um ensaio de crescimento de um cristal de HEWL.....	73
Figura 4.1: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de crescimento/dissolução constituída por: A) 2 mL de água, B) gotas de solução de HEWL colocadas num cilindro de vidro (<i>glass sitting drop rods</i>) e C) 1 mL de óleo de parafina.....	82
Figura 4.2: (A) Programa de temperatura imposto para promover a cristalização (a 10 °C) e a dissolução dos cristais (a 37 °C). As barras brancas representam 1.0 mm de escala. O diâmetro equivalente L dos cristais selecionados foi seguido ao longo do tempo (B e C). Cores diferentes representam cristais diferentes.....	84
Figura 4.3: Variação de RG (símbolos abertos) e RD (símbolos a cheio) de cristais (identificados a cores diferentes) ao longo de um período de 3 horas em cada ciclo de temperatura.....	86
Figura 4.4: A perda de atividade enzimática de HEWL em gotas de 0.7 μL (azul) e 0.4 μL (vermelho) submetidas a condições experimentais e ao programa de temperatura descrito na Figura 4.2A.	87
Figura 4.5: Esquema detalhado do mecanismo de adsorção interfacial de moléculas de proteína na interface líquido/ óleo que promove a desnaturação progressiva de proteínas globulares, e por sua vez, a redução de moléculas de água disponíveis.....	90

Figura 4.6: (A) Perfis de concentração de HEWL durante os períodos de crescimento (símbolos abertos) e de dissolução (símbolos cheios). (B) Velocidades de crescimento cristalino (RG , símbolos abertos) e dissolução (RD , símbolos a cheio) determinadas com (C) perfis de atividade termodinâmica da HEWL ativa e da HEWL total, em unidades arbitrárias; (D) Valor de RG e RD no início e fim de cada ciclo calculados com base no perfil de atividade termodinâmica. 92

Figura 5.1: Ilustração esquemática do efeito de purificação e envenenamento causado pelo aumento de σ com o tempo ($R_\sigma > 0$). 107

Figura 5.2: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de crescimento cristalino constituída por: A) 2.4 mL de solução sobressaturada de HEWL contendo um cristal em crescimento e B) 1 mL de óleo de parafina..... 109

Figura 5.3: Determinação de velocidade de crescimento da face $\{101\}$ dos cristais de HEWL a temperatura (e ΔT) constante. Inserções: a uma dado nível de ΔT , G_e é obtida pelo declive da curva de ΔL versus tempo. Os valores de G_e medidos estão representados em função de ΔT e ajustados pela equação 5.9 (linha sólida; curva G_e ; $k = 1.0 \times 10^{-6}$ mm/min e $b = 1.98$ para um intervalo de confiança a 95 % (linhas a tracejado). 110

Figura 5.4: Cinéticas de crescimento da face $\{101\}$ dos cristais de HEWL durante o período de aquecimento e de arrefecimento com alteração de $R\Delta T$ de (A) ± 2.00 °C/h e (B, C) ± 2.67 °C/h. 112

Figura 6.1: A) Influência teórica da sobressaturação σ na velocidade de crescimento cristalino em meio puro e na presença de impurezas descrita pelos modelos CAM e CAMUS. B) Fenómenos de crescimento cristalino catastrófico e de histerese visíveis em curvas G . As setas indicam a direção de variação de σ 120

Figura 6.2: Exemplo de perfis de temperatura T (linha sólida) e de sobressaturação σ (linha a tracejado) adotados durante a observação de cristais de HEWL em crescimento a diferentes velocidades de variação de σ ($R\sigma$)..... 126

Figura 6.3: Parâmetros $K1$ e $K2$ obtidos a partir de velocidades de crescimento da das faces $\{101\}$ de cristais de HEWL em soluções puras ($G0$) e impuras em condições de estado estacionário (Ge).	128
Figura 6.4: Evolução do crescimento da normal ΔL da face $\{101\}$ de HEWL durante velocidades de variação de σ (A) rápida, (B) intermédia e (C) lenta, em ensaios realizados em triplicado. As setas indicam a direção de variação de σ	130
Figura 6.5: Influência da sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) da faces $\{101\}$ dos cristais de HEWL determinada em ensaios com velocidade de variação de σ (A) rápida, (B) intermédia e (C) lenta. As setas indicam a direção de variação de σ ..	132
Figura 6.6: Influência de sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) das faces $\{101\}$ de cristais de paracetamol, medida por interferometria a laser <i>in situ</i> ao longo de ensaios de aumento (círculos abertos) e diminuição (círculos a cheio) de σ (Shekunov et al., 1997). As setas indicam a direção da variação de σ em dois ensaios independentes.	135
Figura 6.7: Influência da sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) das faces $\{101\}$ de cristais de sulfato de potássio, medida por microscopia ótica em ensaios de diminuição (círculos a cheio) e aumento (círculos abertos) de σ em soluções puras (linha a preto) e na presença de impurezas (círculos) a uma velocidade de variação do sobrearrefecimento de $\pm 0.2 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ (Guzman et al., 2001).....	137
Figura 7.1: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de nucleação constituída por: A) 2 mL de água, B) cilindro de vidro (<i>glass sitting drop rods</i>) no qual eram colocadas gotas de solução de HEWL e C) 1 mL de óleo de parafina.	151
Figura 7.2: Influência da temperatura (T) e da concentração de HEWL (c_{HEWL}) no tempo de indução para nucleação cristalina (t_1)......	152
Figura 7.3: Representação em escala log-linear da influência da concentração de proteína na velocidade de nucleação de cristais (J)......	155

Figura 7.4: Dados de DLS obtidos para soluções de 40 mg/mL de HEWL contendo 3 % (w/v) de NaCl, a pH 4.7 e 16.0 °C (linhas a cheio) e de 50 mg/mL de HEWL isento de NaCl (linha a tracejado). As cores representam os diferentes tempos de incubação diferentes indicados na barra lateral. 157

Figura 7.5: (A) Influência da concentração inicial de HEWL na distribuição de tamanhos de proteína solúvel. O conjunto de dados de DLS foi recolhido ao fim de <30 minutos de incubação a 16.0 °C de soluções de HEWL contendo 3 % (w/v) NaCl. (B) Composição oligomérica calculada a partir de dados de DLS representados em (A).. 158

Figura 7.6: Crescimento de aglomerados metastáveis em condições de cristalização de 40 mg/mL de HEWL, 3 % (w/v) de NaCl a pH 4.7 e 16.0 °C (sobressaturação ~ 8.9). Os asteriscos (**) indicam o tempo estimado da formação dos primeiros cristais. 165

Figura 7.7: Agregação de proteínas em condições de 50 mg/mL de HEWL, 3 % (w/v) de NaCl, a pH 4.7 e 25.0 °C (sobressaturação ~ 4.5). A evolução no tempo do (A) raio hidrodinâmico médio de proteína solúvel *R*₁, (B) % do pico de proteína solúvel e (C) total de luz dispersa. O asterisco indica o tempo estimado de formação de (*) aglomerados metastáveis e (**) cristais. 166

Figura 7.8: Caminhos promotores e não promotores da cristalização de HEWL. 168

Lista de Tabelas

Tabela 5.1: Parâmetros da equação 5.10 ajustados numericamente aos resultados representados na Figura 5.4.....	111
Tabela 7.1: Constantes de equilíbrio calculadas da equação 7.1 para diferentes concentrações de HEWL.	161

Motivação e objetivos

Os avanços na compreensão de sistemas biológicos a nível molecular têm sido possíveis através do conhecimento detalhado das estruturas moleculares tridimensionais de proteínas. Para isso, é crucial produzir cristais de proteína com tamanho adequado e de elevada qualidade para a realização de estudos de difração em raio-X e em neutrões. Infelizmente, a obtenção de cristais de proteína e o seu crescimento são muitas vezes o principal obstáculo para a determinação da estrutura molecular (Durbin and Feher 1996). A natureza complexa das moléculas de proteína torna a sua cristalização difícil e um processo desafiador (Saikumar et al., 1998). Além disso, na cristalização de proteínas, a nucleação é um passo limitativo na obtenção de cristais de elevada qualidade, porque o conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo ainda é muito escasso. Em alguns casos, medições experimentais das cinéticas de nucleação têm sido ajustadas a modelos matemáticos existentes (Bessho et al., 1994; Georgalis et al., 1997). Em outros estudos concluiu-se que a nucleação dos cristais das proteínas analisadas segue as teorias clássicas de nucleação, ou seja, está de acordo com os mecanismos estabelecidos para a nucleação de líquidos simples ou sais inorgânicos em vapor ou solução (Feher and Kam 1985; Malkin and McPherson 1994). Um ponto de vista contraditório é que mecanismos totalmente diferentes daqueles encontrados para moléculas inorgânicas deveriam aplicar-se a cristais de proteínas (Littlechild 1991).

Estudos recentes revelaram que oscilações de temperatura podem contribuir para o aumento da nucleação homogénea, diminuindo a barreira energética associada a este passo. É expectável que este efeito se torne mais pronunciado à medida que a amplitude de oscilação aumenta, por outro lado, períodos de oscilação muito inferiores ao tempo de indução não deverão influenciar significativamente a formação de núcleos (C. Ferreira et al. 2011). Neste trabalho pretende-se estudar o efeito desta variável num número considerável de ensaios de cristalização utilizando um método modificado de *microbatch* que evita a evaporação da gota (Martins et al., 2008). Além disso, as cinéticas de nucleação serão caracterizadas nas regiões do diagrama de fases situadas na fronteira limite da zona metastável. Para tal, serão obtidos cristais a diferentes sobressaturações de solução de lisozima, variando a sua concentração e a temperatura

de solução. Este trabalho permitirá estudar as condições da solução que promovem ou inibem a nucleação de cristais de proteína, conduzindo assim a uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem este fenómeno.

Os efeitos indesejáveis das impurezas nas soluções são também um aspeto crítico durante a produção de materiais cristalinos nas indústrias, bem como, na produção de cristais de elevada qualidade para aplicações óticas e eletrónicas, e para a determinação de estruturas tridimensionais usando cristalografia de raios-X (Chayen & Saridakis, 2008; McPherson, 2004; Thomas et al., 2004). Por isso, ir-se-á investigar o efeito das impurezas na cinética de crescimento cristalino de lisozima. Pretende-se identificar fenómenos de histerese durante o crescimento cristalino de proteína na presença de impurezas. O estudo deste fenómeno ajudará a entender o comportamento das impurezas no crescimento cristalino, e assim, minimizar os efeitos prejudiciais destas na solução (Caylor et al., 1999; Xu et al., 2005).

Referências Bibliográficas

- Bessho, Y., Ataka, M., Asai, M., & Katsura, T. (1994). Analysis of the crystallization kinetics of lysozyme using a model with polynuclear growth mechanism. *Biophysical Journal*, 66(2), 310–313.
- Caylor, C. L., Dobrianov, I., Lemay, S. G., Kimmer, C., Kriminski, S., Finkelstein, K. D., ... Thorne, R. E. (1999). Macromolecular impurities and disorder in protein crystals. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 36(3), 270–281.
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5, 147–153.
- Durbin, S. D., & Feher, G. (1996). *Protein crystallization. Annual review of physical chemistry* (Vol. 47).
- Feher, G., & Kam, Z. (1985). Nucleation and growth of protein crystals: General principles and assays. *Methods in Enzymology*, 114(C), 77–112.
- Ferreira, C., Crespo, R., Martins, P. M., Gales, L., Rocha, F., & Damas, A. M. (2011).

Small temperature oscillations promote protein crystallization. *CrystEngComm*, *xx*, 1–7.

Georgalis, Y., Umbach, P., Raptis, J., & Saenger, W. (1997). Lysozyme aggregation studied by light scattering. II. Variations of protein concentration. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, *53*, 703–712.

Littlechild, J. A. (1991). Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? *Journal of Physics D: Applied Physics*, *24*(2), 111–118.

Malkin, A. J., & McPherson, A. (1994). Light-scattering investigations of nucleation processes and kinetics of crystallization in macromolecular systems. *Acta Crystallographica Section D*, *50*(4), 385–395.

Martins, P. M. ; Pesssoa, J.; Sàrkàny; Rocha, F.; Damas, A. M. (2008). Rationalizing Protein Crystallization Screenings through Water Equilibration Theory and Protein Solubility Data. *Crystal Growth & Design*, *8*(12), 4233–4243.

McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, *34*, 254–265.

Saikumar, M. V, Glatz, C. E., & Larson, M. A. (1998). Lysozyme crystal growth and nucleation kinetics. *Journal of Crystal Growth*, *187*, 277–288.

Thomas, T. N., Land, T. A., Martin, T., Casey, W. H., & DeYoreo, J. J. (2004). AFM investigation of step kinetics and hillock morphology of the {100} face of KDP. *Journal of Crystal Growth*, *260*, 566–579.

Xu, D., Xue, D., & Ratajczak, H. (2005). Morphology and structure studies of KDP and ADP crystallites in the water and ethanol solutions. *Journal of Molecular Structure*, *740*(1–3), 37–45.

Organização da tese

Na parte inicial da tese, mais propriamente no **Capítulo 1**, faz-se uma retrospectiva sobre conceitos gerais de cristalização, dando particular ênfase à cristalização de proteínas, biomoléculas de impacto biológico e farmacêutico, e ao papel das impurezas neste processo. O Capítulo 2 aborda os principais métodos convencionais de cristalização de proteínas.

As técnicas e instalações experimentais estão detalhadas no **Capítulo 3**.

A Parte I, denominada “Dissolução”, é constituída pelo **Capítulo 4** que propõe uma abordagem em termos fundamentais ao mecanismo de dissolução de lisozima, nomeadamente alguns fenómenos anómalos observados.

A Parte II, “Crescimento Cristalino”, composta pelos **Capítulos 5 e 6**, procura explicar fenómenos de histerese e crescimento cristalino catastrófico identificados nas experiências de crescimento cristalino com base num novo modelo (CAMKOD), fundamentado em dois modelos para adsorção de impurezas (CAM e CAMUS), presentes na literatura.

Na Parte III, intitulada “Nucleação”, contém o **Capítulo 7** que estuda de forma fundamental a influência da composição oligomérica no mecanismo de nucleação de cristais de lisozima.

No **Capítulo 8**, são apresentadas as principais conclusões do trabalho realizado e algumas sugestões para trabalhos futuros.

Por último, em **Anexo** encontra-se a informação suplementar sobre derivação matemática do modelo de adsorção competitiva compreendendo a ocupação dinâmica de *kinks*.

1. Teoria de cristalização

A cristalização é uma operação de separação e de purificação baseada em mecanismos de transferência de massa. Na cristalização criam-se condições termodinâmicas que levam as moléculas a se aproximarem e a agruparem-se em estruturas altamente organizadas, os cristais. A força diretriz para a cristalização em solução é a existência de sobressaturação (Nagy & Braatz, 2012; Narayanan & Liu, 2003). Numa solução sobressaturada, o primeiro passo é a formação de uma nova fase por nucleação homogênea, ao que se segue o passo de crescimento envolvendo a difusão do soluto até a superfície, e a sua adsorção e incorporação na estrutura cristalina. Todos estes passos são regidos por leis físicas. Assim, de forma sucinta, o processo de cristalização é composto por dois estágios consecutivos: nucleação e crescimento (Erdemir et al., 2008).

O controlo do processo de cristalização é importante para definição das características físicas do material cristalino, nomeadamente o hábito do cristal, distribuição de tamanhos, polimorfismos e pureza (Nagy & Aamir, 2012).

1.1 Cristalização de proteínas

As proteínas integram um grupo de macromoléculas biológicas com um papel muito importante nos principais processos vitais. As proteínas podem atuar conferindo estrutura, catalisando reações químicas, ou em funções de transporte e regulação do funcionamento celular. As proteínas são moléculas complexas que podem assumir uma variedade de tamanhos, formas, estruturas e funções. Por outro lado, as proteínas podem ser muito específicas; uma pequena mutação na sequência de aminoácidos pode provocar a disfunção integral da molécula de proteína, e as consequências, por vezes, são letais. Por esta razão, a compreensão da relação entre a estrutura e função das moléculas de proteína é de grande relevância nas áreas farmacêutica, médica,

bioquímica e biológica, tanto do ponto de vista fundamental como aplicado (McPherson, 1999).

Para entender a relação entre a estrutura e a função, é necessário conhecer a estrutura da molécula de proteína. Para isso, é crucial produzir cristais de proteína com tamanho adequado e de elevada qualidade para a realização de estudos de difração em raio-X e em neutrões (ver Figura 1.1). Infelizmente, a obtenção de cristais de proteína e o seu crescimento são muitas vezes o principal obstáculo para a determinação da estrutura (Durbin & Feher, 1996).

Os maiores progressos na biologia estrutural foram alcançados com recurso a cristais macromoleculares com boa difração, obtidos por cristalografia de raio-X. A cristalização de proteínas evoluiu paralelamente com estes desenvolvimentos científicos (Giegé, 2013a; Luft et al., 2014; McPherson & Gavira, 2014).

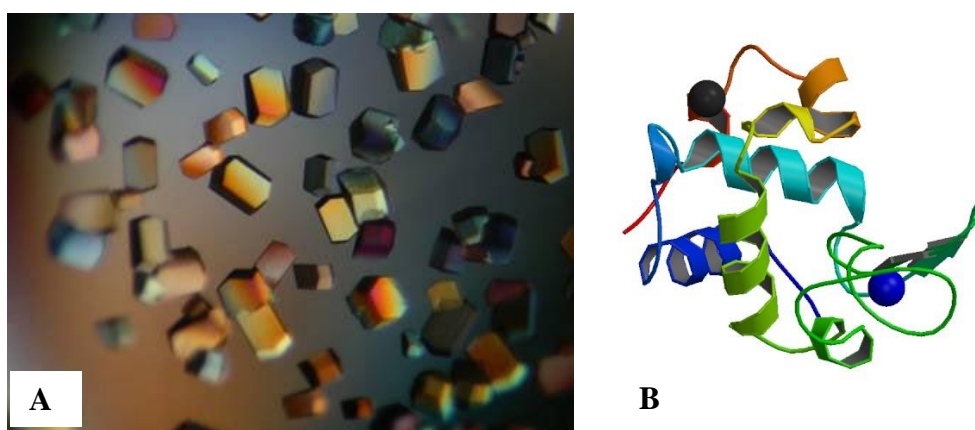


Figura 1.1: A) Cristais tetragonais de lisozima de clara de ovo de galinha. B) Estrutura de molécula de lisozima determinada por difração em raio-X.

A natureza complexa das moléculas de proteína torna a sua cristalização difícil e um processo desafiador (Saikumar et al., 1998). As proteínas são estáveis apenas numa gama estreita de condições bioquímicas e a sua cristalização depende de muitas variáveis, tais como a natureza da proteína, tipo de precipitante, pH, temperatura, sobressaturação, entre outras. Além disso, a qualidade do cristal de proteína é condicionada pela existência de defeitos e impurezas na rede cristalina (McPherson, 2004). Por este motivo, desde a década de 1950, os mecanismos envolventes na cristalização de proteínas tornaram-se objeto de estudo mais aprofundado a fim de proporcionar caracterização estrutural das proteínas mais importantes. E os avanços

científicos vieram proporcionar uma mudança gradual de paradigma no que diz respeito à cristalização de proteínas. A cristalização de proteínas começou por ser considerada uma arte, um engenho de conceção de cristais por tentativa/erro. Esta ideia, que ainda permanece popular, explica-se, em parte, pelas quantidades limitada de amostra disponível para estudos fundamentais de cristalização. Com o tempo, houve uma maior consciencialização para a necessidade de estabelecer estratégias de otimização de forma racional por seleção assertiva de parâmetros promotores de cristalização. Desde então, foram desenvolvidos inúmeras técnicas de cristalização e estudos sistemáticos visando compreender os efeitos globais ou específicos de tais parâmetros e a cristalização de determinadas proteínas (Durbin & Feher, 1996; Giegé, 2013a; Littlechild, 1991).

Ao longo dos anos, a cristalização de proteínas tem sido amplamente estudada no campo fundamental, usando a lisozima como sistema modelo. A cristalização de proteínas membranares integrais (Buschmann et. al., 2014), proteínas intrinsecamente desordenadas (Bukowska & Grütter, 2013), conjuntos macromoleculares (Yonath, 2011) e complexos de núcleo proteicos (Giegé, 2013b) são considerados os maiores desafios atuais.

A existência de proteínas difíceis de cristalizar pelos métodos tradicionais de tentativa/erro continua a ser um problema recorrente apesar de melhoramentos nos métodos de cristalização, ao nível da automatização (Stewart & Mueller-Dieckmann, 2014) e miniaturização (Zhu & Fang, 2013). Uma estratégia biofísica tem vindo a ser desenvolvida, utilizando ferramentas tecnológicas racionalmente concebidas para controlar o passo de nucleação e aumentar as taxas de sucesso de cristalização (Garcia-Caballero et al., 2011). Nomeadamente, algumas destas mudanças foram integradas em projetos genómicos estruturais que adotaram novos nucleantes (Sahir et al., 2014) e políticas de sementeira (D'Arcy et al., 2014), ou cristalização em gel (Gavira et al., 2014). Também, é de realçar o contributo do trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de investigação que potenciou novas estratégias de otimização no processo de cristalização. Os trabalhos anteriores mostraram que a radiação de ultrassons (Crespo et al., 2010), pequenas oscilações de temperatura (Ferreira et al., 2011) e perfis de sobressaturação controlados (Martins et al., 2008) podem beneficiar a formação e a qualidade de cristais de proteína.

Por sua vez, a estratégia bioquímica é centrada nas fases que precedem a nucleação através de novas formas de estabilização da conformação macromolecular. O sucesso desta abordagem está patente no rápido aumento do número de estruturas cristalográficas envolvendo complexos de proteína-anticorpo (Bukowska & Grütter, 2013), proteínas de fusão (Rosenbaum et al., 2007) e proteínas truncadas (Derewenda, 2004). Na verdade, a variável mais influente no processo de cristalização é a própria proteína (Bolanos-Garcia & Chayen, 2009; Dale et al., 2003; Deller, et al., 2016).

A cristalização de proteínas, de forma análoga às moléculas pequenas, é governada por duas fases: nucleação (geralmente, o passo limitante) e crescimento (o passo chave para a perfeição do cristal). A compreensão destas fases tem evoluído notoriamente mas continua a existir lacunas na descrição completa de cada uma delas (McPherson & Kuznetsov, 2014).

1.2 Nucleação

A nucleação é o processo mais difícil de abordar teórica e experimentalmente porque representa uma transição de fase de primeira ordem na qual as moléculas passam de um estado totalmente desordenado para um estado ordenado (McPherson, 2004). A nucleação marca o início da cristalização e determina muitas das propriedades do cristal em formação. Se for pretendido um dado polimorfismo podem ser definidas as condições de nucleação que conduzem preferencialmente a esse polimorfismo. Quando a nucleação é rápida, os cristais, na sua maioria, são produzidos quase em simultâneo. O crescimento destes cristais reduz a concentração de soluto em solução e pode conduzir à cessação da nucleação nas fases posteriores da cristalização. Consequentemente, estes cristais em crescimento vão assumir tamanhos aproximadamente idênticos. Em contraste, quando a nucleação é lenta, a formação de cristais ocorre de forma intervalada no tempo, a sobressaturação diminui lentamente e obtém-se uma população de cristais com diferentes tamanhos. Assim, o controlo da nucleação é um meio de controlo das propriedades do cristal, tais como, o tamanho, distribuição de tamanhos e polimorfismos (Vekilov, 2010).

A cristalização de um sistema não depende só da existência de uma condição de sobressaturação mas também da presença de elementos sólidos em solução que atuam

como centros de cristalização. A nucleação pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida artificialmente, contudo, nem sempre é possível identificar a sua origem (Mullin, 2001). A nucleação pode ser induzida por agitação, choques mecânicos, fricção e pressões extremas em solução, bem como por materiais sólidos existentes no meio ou pelas interfaces sólido-líquido (Chayen, 2004; Liu, 2000; Tsekova et al., 2012). Outros estudos revelam que a nucleação pode também ser promovida por outros agentes externos, tais como, campos magnéticos e elétricos, radiação ultravioleta, radiação ultrassônica e sônica, radiação gama, radiação raio-X, ultrassons e descargas elétricas (Chen et al., 2012; Mullin, 2001; Ziabicki & Jarecki, 1996).

Conforme apresentado na Figura 1.2, a nucleação pode ser classificada primária ou secundária.

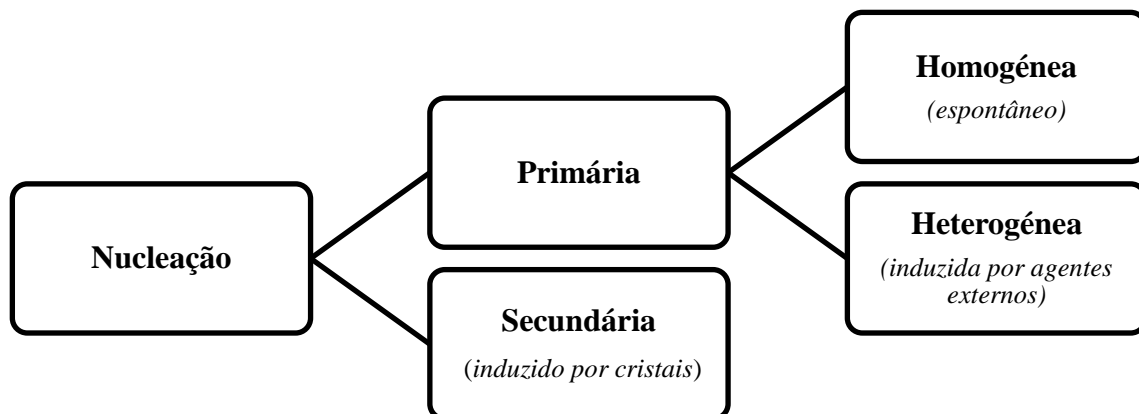


Figura 1.2: Classificação do processo de nucleação baseado no mecanismo de nucleação do cristal.

A nucleação primária desenvolve-se em sistemas sobressaturados na ausência de qualquer matéria cristalina, enquanto a nucleação secundária ocorre na vizinhança de cristais presentes no sistema sobressaturado. Por sua vez, a nucleação primária pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo os principais: nucleação homogénea e nucleação heterogénea. A nucleação homogénea ocorre em materiais com elevado grau de pureza sendo que, sob condições específicas, o próprio movimento aleatório dos átomos ou moléculas resulta no ordenamento dos mesmos. Este processo de

ordenamento na nucleação heterogénea, por outro lado, é promovido inicialmente pela presença de agentes externos (Mullin, 2001).

1.2.1 Teoria clássica da nucleação

A teoria clássica da nucleação foi inicialmente abordada na condensação de um vapor num líquido, e depois estendida para a cristalização de soluções e metais fundidos (Becker, R., Döring, 1935; Gibbs, 1948; Volmer, 1939). A teoria clássica da nucleação descreve a cinética de nucleação e prevê a contribuição de fatores termodinâmicos (sobressaturação e temperatura) e cinéticos (constante de difusão de monómeros e velocidade de incorporação de monómeros nos aglomerados críticos em crescimento) na velocidade de nucleação.

A nucleação acontece quando o sistema ultrapassa uma barreira energética que surge como resultado da competição entre o ganho energético na transferência das moléculas da solução para o interior do núcleo e o custo energético na criação da interface entre a solução e o núcleo (Akella et al., 2014). A variação da energia livre durante a formação de um núcleo a partir do meio da solução pode ser definida como:

$$\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_s \quad (1.1)$$

Sendo ΔG_v e ΔG_s as energias de volume e de superfície, respetivamente.

A energia de superfície ΔG_s pode ser expressa como o produto da área da superfície do aglomerado A e a tensão superficial γ presente entre a superfície cristalina em desenvolvimento e a solução sobressaturada do meio:

$$\Delta G_s = A\gamma \quad (1.2)$$

A energia de volume é definida como a diferença entre o potencial químico de n moléculas em solução μ_α e o potencial químico da fase sólida μ_β :

$$\Delta G_v = -n(\mu_\alpha - \mu_\beta) \quad (1.3)$$

Os potenciais químicos das moléculas em solução e na fase sólida podem ser expressos em função das suas respectivas atividades a_α e a_β :

$$\mu_\alpha = k_B T \ln a_\alpha \quad (1.4)$$

$$\mu_\beta = k_B T \ln a_\beta \quad (1.5)$$

Sendo k_B a constante de Boltzmann, e definindo a sobressaturação S como a razão da atividade (ou concentração) da solução pela atividade (ou concentração) em equilíbrio, obtém-se:

$$\mu_\alpha - \mu_\beta = k_B T \ln S \quad (1.6)$$

Substituindo na equação 1.2, obtém-se:

$$\Delta G_s = -n[k_B T \ln S] + A\gamma \quad (1.7)$$

Considerando que os aglomerados apresentam forma esférica (a tensão superficial não varia com a direção) e assumindo que o volume molar ocupado por uma unidade de crescimento num cristal, v , é a razão entre a volume da célula unitária e o número de Z moléculas por célula unitária, pode-se expressar a energia como função do raio dos núcleos esféricos:

$$\Delta G = \frac{4}{3} \frac{\pi r^3}{v} k_B T \ln S + 4\pi r^2 \gamma \quad (1.8)$$

A equação 1.7 é conhecida como a expressão Gibbs-Thompson para a energia livre duma gota de líquido de raio r que condensa a partir do seu vapor. A mesma expressão pode ser aplicada a um cristal em crescimento na sua solução, se se incluir a

anisotropia do cristal. Sendo assim, nas faces i dum cristal haverá diferentes valores de tensão superficial, e por isso, γ é substituído por uma expressão do tipo $\sum A_i \gamma_i$.

A Figura 1.3 apresenta graficamente a expressão de Gibbs-Thompson para diferentes valores de sobressaturação. A sobressaturações muito elevadas, o tamanho de um núcleo crítico torna-se mais pequeno que a estrutura unitária, a barreira de ativação desaparece e forma-se a fase amorfa.

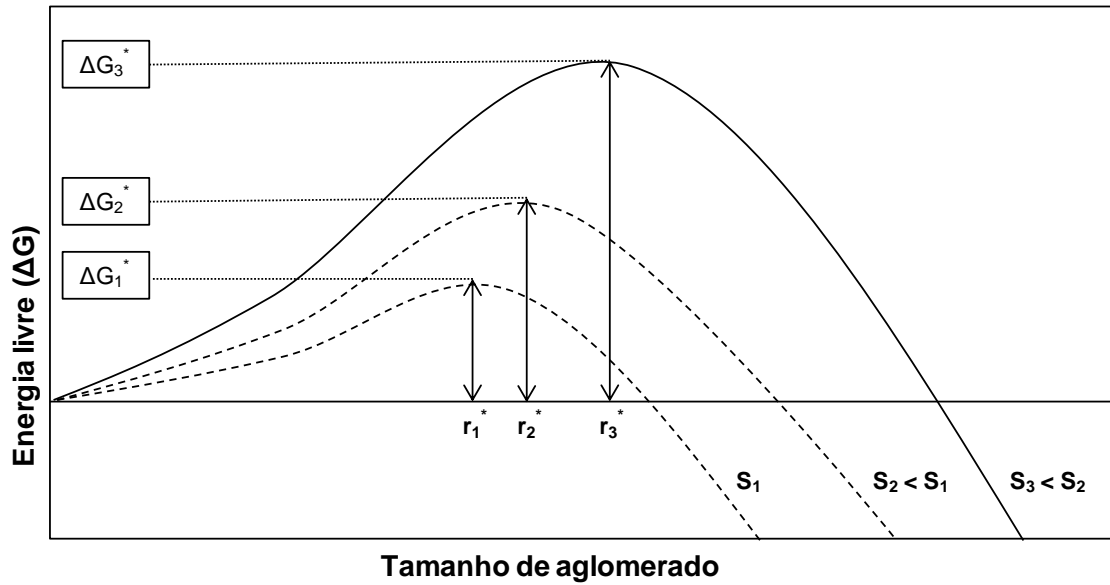


Figura 1.3: Variação da barreira de ativação em função da sobressaturação (García-Ruiz, 2003).

Verifica-se que ΔG aumenta com r até que se atinge o valor crítico ΔG^* , e depois diminui. Quando o aglomerado apresenta um tamanho maior que o tamanho crítico, observa-se a diminuição da energia livre durante o crescimento, ou seja, o aglomerado torna-se mais estável à medida que cresce. Por conseguinte, o tamanho crítico representa o tamanho mínimo dum núcleo estável. Para calcular o valor do raio crítico r^* , é necessário diferenciar a equação 1.8 com respeito ao r do seguinte modo:

$$\frac{d\Delta G}{dr} = 0 \quad (1.9)$$

Então,

$$r^* = \frac{2v\gamma}{k_B T \ln S} \quad (1.10)$$

Substituindo r^* na equação 1.8, obtém-se o valor da energia de ativação ΔG^* :

$$\Delta G^* = \frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3[k_B T \ln S]^2} \quad (1.11)$$

Conforme é visível na Figura 1.3, os valores de r^* e ΔG^* variam inversamente com a sobressaturação, r^* tende para o infinito quando S tende para 1. A existência da barreira energética explica o facto de apesar duma solução apresentar condições termodinâmicas para a precipitação, esse fenómeno só ocorre espontaneamente quando é ultrapassado um dado valor de sobressaturação (García-Ruiz, 2003).

1.2.2 Velocidade de nucleação

A velocidade de nucleação J pode ser definida como o número de núcleos estáveis formados, por unidade de tempo e de volume. Esta velocidade pode ser expressa por uma equação de Arrhenius (Volmer, 1939):

$$J = k_0 \exp\left(\frac{-\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad (1.12)$$

Substituindo o valor de ΔG^* , obtém-se:

$$J = k_0 \exp\left(-\frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3(k_B T)^3 [\ln S]^2}\right) \quad (1.13)$$

O fator pré-exponencial k_0 é difícil de derivar teoricamente. Esta constante está relacionada com a cinética de ligação das unidades de crescimento ao aglomerado em formação e depende da viscosidade, carga molecular, volume molecular e densidade da solução. Uma vez que o termo exponencial está associado à barreira de ativação, parâmetros externos, tais como, a temperatura, concentração e a pressão vão afetar a

velocidade de nucleação. É digno de nota que o fator de forma $16\pi/3$ é válido apenas quando se assume que o aglomerado é esférico (García-Ruiz, 2003; Vekilov, 2010).

O tempo de indução para nucleação é um parâmetro importante que descreve a cinética de nucleação. O tempo de indução é definido como o tempo decorrido entre a conceção de condições de sobressaturação e a formação de núcleos de tamanho crítico. Para um dado volume de solução, o tempo de indução τ é o inverso da velocidade de nucleação J :

$$\tau = \frac{k_B^{\tau e}}{J} \quad (1.14)$$

Aplicando logaritmos e expressando τ como uma função de S :

$$\log \tau = k_0 + \left[\frac{16\pi v^2 \gamma^3}{2 \cdot 3^3 \times 3k_B^3 T^3} \right] / \log^2 S \quad (1.15)$$

Por isso, quando se representa $\log \tau$ *versus* $1/\log^2 S$, obtém-se uma relação linear cujo declive m é dado por:

$$m = \frac{16\pi v^2 \gamma^3}{2 \cdot 3^3 \times 3k_B^3 T^3} \quad (1.16)$$

Uma vez que é difícil determinar experimentalmente o tempo de nucleação, na prática, τ é calculado a partir do tempo de espera para a nucleação. O tempo de espera para a nucleação é o intervalo de tempo decorrido entre a configuração duma solução de proteína para um dado valor de sobressaturação e a deteção do primeiro núcleo formado. O tempo de espera é a soma de três fatores (Mullin, 2001):

$$t_w = t_d + t_n + t_g = \tau + t_g \quad (1.17)$$

O primeiro termo t_d é o tempo necessário para atingir uma distribuição estacionária de tamanhos de aglomerados pré-críticos, o segundo termo t_n é o tempo requerido para

formar um núcleo de tamanho crítico, e o terceiro termo t_g é o tempo necessário para que esses núcleos formados cresçam até atingirem dimensões que possibilitem a sua detecção experimental. Por isso, t_g depende da técnica usada para detecção da nucleação (Martin et al., 1991). Para um conjunto de dados obtidos com a mesma técnica, o valor de τ pode ser substituído por t_w na equação 1.17.

O tempo de indução é um dos poucos parâmetros relacionados com a nucleação que pode ser avaliado experimentalmente. De acordo com a equação 1.15, obtém-se uma relação linear entre $\log \tau$ e $1/\log^2 S$, cujo declive é dado pela equação 1.16. Sendo assim, a uma temperatura constante, é possível obter o valor da tensão superficial γ . Em seguida, usando esse valor de γ na equação 1.10, estima-se o tamanho dos núcleos críticos. Os autores Galkin e Vekilov (2000, 2001) encontraram valores para γ de cerca de 0.6 mJm^{-2} correspondente a um aglomerado com cerca de 5 a 10 moléculas. Valores semelhantes foram também estimados por Drenth e seus colaboradores (2003). A relação linear obtida a partir da equação 1.15 foi validada para muitos compostos de pequenas moléculas com crescimento a partir da solução. No entanto, na maioria dos casos, a relação entre $\log \tau$ e $1/\log^2 S$ apresenta melhor ajuste com duas relações lineares. A relação linear para sobressaturações elevadas refere-se à nucleação homogénea enquanto que a outra relação para valores baixos de sobressaturação corresponde à nucleação heterogénea (García-Ruiz, 2003).

1.2.3 Nucleação de proteínas

A nucleação de proteínas pode ser descrita pela teoria clássica de nucleação (ver tópico 1.2.1) e, em contraste com as moléculas pequenas, necessita de níveis de sobressaturação extremamente elevados para ocorrer (McPherson & Kuznetsov, 2014). Contudo, o mecanismo pelo qual se forma o núcleo de tamanho crítico (García-Ruiz, 2003; Vekilov, 2010) continua a ser motivo de debate neste domínio científico. Alguns investigadores defendem a ideia que ocorre a formação preliminar de uma fase densa de proteína em solução, e que esta fase estará na origem da formação dos núcleos críticos. Esta ideia tem sido aplicada a uma variedade de sistemas nos últimos anos (Vekilov, 2005; Vekilov & Vorontsova, 2014; Vorontsova et al., 2015; Vekilov, 2016).

Um modelo consistente com a maioria das observações é que as proteínas se associam inicialmente por forças van der Waals ou outras interações não específicas para produzir um primeiro agregado (McPherson & Kuznetsov, 2014). Na Figura 1.4 está ilustrado o conceito de nucleação de cristais e desenvolvimento a partir de um agregado inicial.

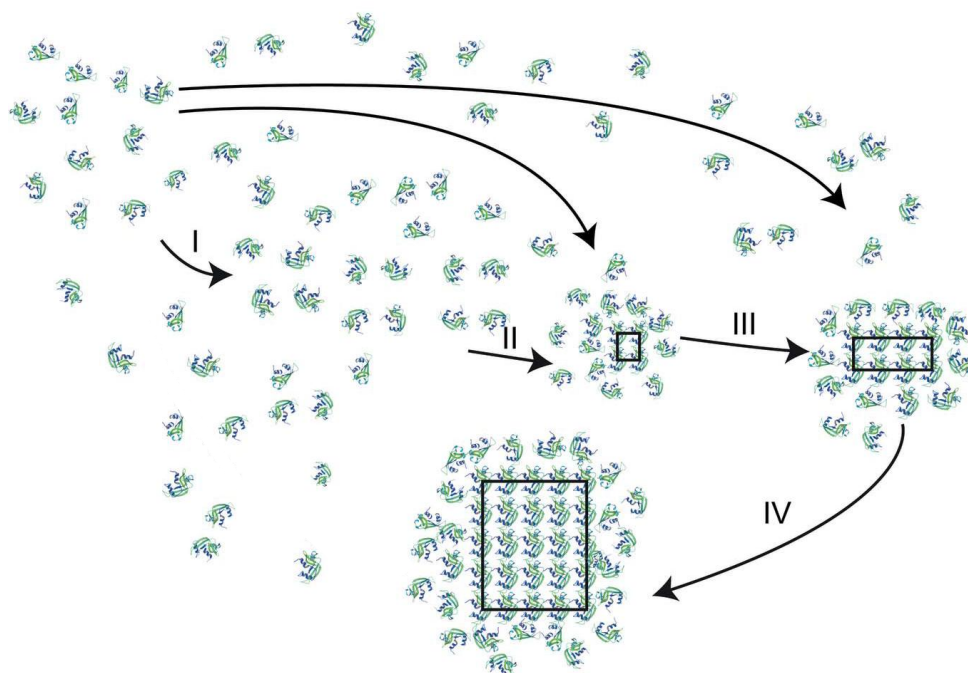


Figura 1.4: Caminho provável de nucleação de proteínas. Os passos I a IV são descritos no corpo de texto (McPherson & Kuznetsov, 2014).

O aumento da sobressaturação promove a associação de moléculas que se auto organizam em agregados maiores (I). O processo pode ser também impulsionado pela libertação de moléculas de água oriundas de moléculas de proteína solvatadas. À medida que o tempo avança, estes agregados reorientam-se, redistribuem-se e estabelecem entre si ligações de hidrogênio mais bem definidas e interações eletrostáticas (II). Desta forma, aglomeração dos agregados será feita de forma ordenada, garantindo estabilidade à estrutura em crescimento que irá evoluir para um núcleo crítico (III). Moléculas livres em solução são então adsorvidas na superfície e aumentam seu tamanho por incorporação na rede cristalina (IV) para produzir o cristal (McPherson & Kuznetsov, 2014).

Diagrama de fases de proteínas

O processo de cristalização pode ser ilustrado por um diagrama de fases que indica qual o estado (líquido, cristalino ou sólido amorfo/precipitado) que é estável sob uma variedade de parâmetros de cristalização. O diagrama de fases torna-se um meio de quantificar a influência de determinados parâmetros na obtenção de cristais, tais como, concentração de proteína, precipitantes, aditivos, entre outros. Assim, analisando o diagrama de fases e as propriedades de solubilidade da amostra é possível otimizar o processo de cristalização.

O diagrama de fases de cristalização é constituído por quatro zonas que representam diferentes níveis de sobressaturação (Chayen, 2004):

- Zona de elevada sobressaturação, na qual a proteína irá precipitar;
- Zona de sobressaturação moderada, onde irá ocorrer nucleação espontaneamente;
- Zona metastável (abaixo da zona de nucleação) de baixa sobressaturação, onde os cristais são estáveis e podem crescer, não havendo a formação de outros cristais (as condições nesta região são as ideais para o crescimento de cristais bem ordenados);
- Zona de subsaturação, na qual a proteína dissolve-se totalmente e nunca ocorre cristalização.

Na figura seguinte está apresentado um diagrama de fases de cristalização de proteínas.

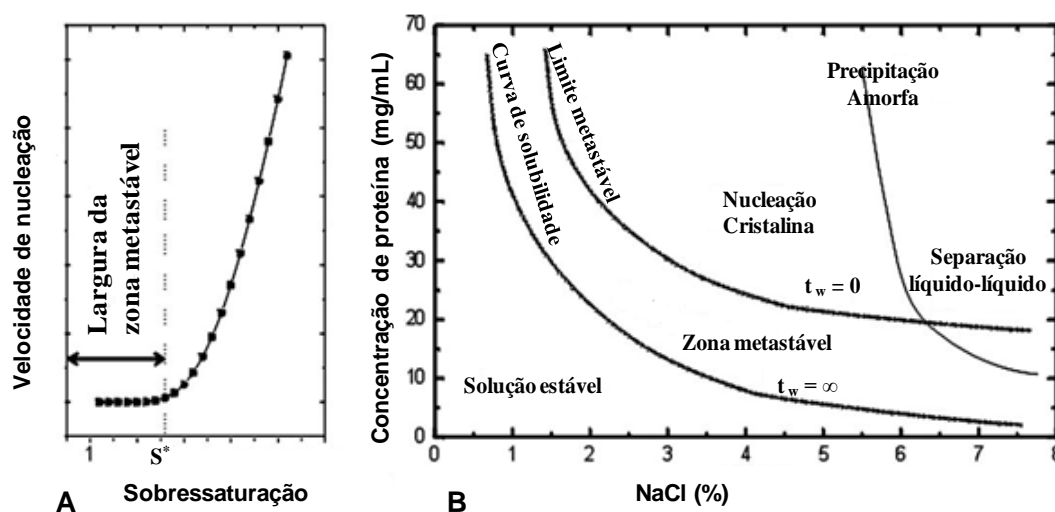


Figura 1.5: A) Velocidade de nucleação em função da sobressaturação. B) Diagrama de solubilidade apresentando as diferentes fases (García-Ruiz, 2003).

Os diagramas de solubilidade de proteínas mais conhecidos (Ostwald-Myers) podem ser explicados com base nas cinéticas de nucleação. A velocidade de nucleação é governada pelo termo exponencial da equação 1.13.

Como mostra a Figura 1.5, a velocidade de nucleação J é muito baixa para valores baixos de sobressaturação e depois J aumenta rapidamente depois de se atingir um determinado valor crítico de sobressaturação S^* . Este facto explica a existência de uma região entre $S = 1$ (saturação) e S^* no diagrama de solubilidade, denominada zona metastável, onde a probabilidade de nucleação é muito baixa. A zona metastável é delimitada por duas curvas de naturezas diferentes: curva de solubilidade (limite inferior) e curva de supersolubilidade (limite superior). Na curva de solubilidade estão presentes as soluções em condições de equilíbrio, isto é, saturadas. A localização desta curva não varia e é de natureza termodinâmica. Uma solução situada nesta curva manter-se-á sempre estável. E nestas circunstâncias a probabilidade de nucleação é nula e o tempo de indução para a nucleação é infinito. Ao contrário da curva de solubilidade, a curva de supersolubilidade ou limite metastável é de natureza cinética. Nesta curva a probabilidade de nucleação é 1, e consequentemente o tempo de indução para nucleação pode ser considerado zero (nucleação instantânea). Qualquer solução situada dentro da zona metastável irá nuclear espontaneamente ao fim de um dado tempo, sendo o tempo de indução dependente da sobressaturação: quanto maior a sobressaturação menor o tempo de indução.

1.3 Crescimento cristalino

Numa solução sobressaturada, após a formação de um núcleo estável (tamanho superior ao tamanho crítico), segue-se o crescimento, no qual o cristal pode atingir dimensões perceptíveis a olho nu. Ao longo de décadas, o mecanismo de crescimento cristalino tem sido amplamente abordado por diversas teorias (Buckley, 1952; Chernov, 1980; Lewis, 1980; Nývlt et al., 1985; Strickland-Constable, 1968; Wells, 1946).

1.3.1 Mecanismo de crescimento baseado na teoria de adsorção em camadas

O conceito de mecanismo de crescimento cristalino baseado na existência de uma camada adsorvida de átomos de soluto ou moléculas numa face cristalina foi primeiro sugerida por Volmer (1939). A teoria desenvolvida por Volmer também denominada por teoria Gibbs-Volmer, é sustentada numa percepção termodinâmica do processo. Quando unidades de crescimento chegam à face do cristal, não integram imediatamente a rede cristalina, mas podem inicialmente migrar ao longo da face do cristal. Existe, assim, uma camada adsorvida disponível para integrar unidades de crescimento da interface, e estabelece-se um equilíbrio dinâmico entre a camada e a solução do meio. A camada de adsorção assume um papel muito importante no crescimento cristalino e na nucleação secundária.

Átomos, moléculas ou iões ligar-se-ão à rede cristalina em locais onde a força de atração é maior, ou seja, nos locais ativos (*kinks*), e em condições ideais, a ocupação irá continuar até que a camada fique completamente coberta (ver Figura 1.6). Para que a face do cristal continue a crescer, ou seja, que ocorra a formação de uma nova camada, é necessário a criação de um centro de cristalização na superfície da face, denominado de núcleos bidimensionais.

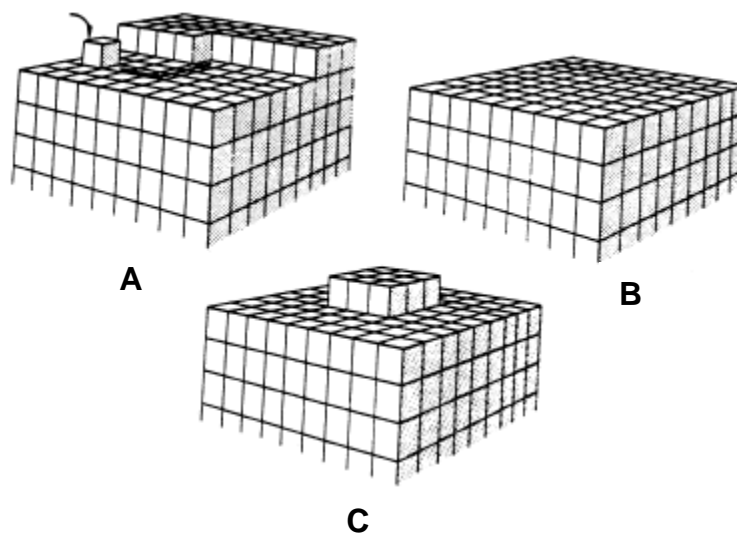


Figura 1.6: Crescimento cristalino de uma superfície sem imperfeições: A) migração direcionada para locais preferenciais; B) camada completa; C) nucleação à superfície (Mullin, 2001).

As expressões para a energia requerida para nucleação bidimensional e para o tamanho crítico de núcleos bidimensionais podem ser derivadas de uma forma similar ao descrito para a nucleação homogênea tridimensional.

O modelo de Kossel (1934) de crescimento da face do cristal está apresentado na Figura 1.7. Este modelo sugere que a superfície de um cristal aparentemente plana, é na verdade constituída por degraus em movimento de altura monoatômica, que pode conter um ou mais locais ativos (*kinks*). Além disso, haverá adsorção de unidades de crescimento (átomos, moléculas ou iões) na superfície do cristal, nos espaços das superfícies ou nos degraus. As unidades de crescimento são facilmente incorporadas no local ativo (*kink*), que se movimenta ao longo do degrau e, assim, a face fica completa. A formação de um novo degrau ocorre por nucleação à superfície e inicia-se nas extremidades da face.

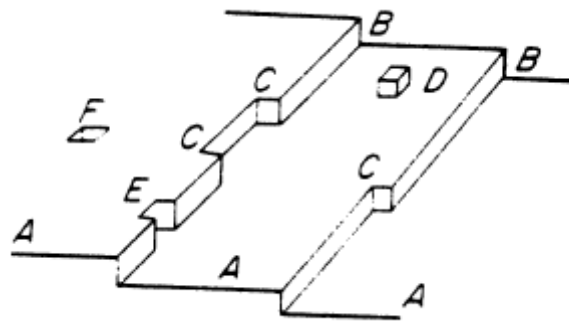


Figura 1.7: Modelo de Kossel de um crescimento da superfície do cristal. (A) superfícies planas. (B) degraus, (C) *kinks*, (D) unidades de crescimentos adsorvidas à superfície, (E) espaços vazios nas arestas e (F) espaços vazios na superfície (Mullin, 2001).

A velocidade de crescimento de cristal deverá ser maior quando as suas faces estão totalmente cobertas com locais ativos (*kinks*). No entanto, durante o crescimento é improvável que o número de *kinks* permaneça elevado. Também, quando o cristal apresenta alguma danificação na sua superfície, primariamente procede rapidamente à sua “cura” e depois continua a crescer a uma velocidade muito menor. Por outro lado, existem faces cristalinas que atingem velocidades de crescimento muito elevadas a sobressaturações relativamente baixas, muito abaixo dos valores necessários para induzir a nucleação à superfície. Estes acontecimentos sugerem que a validade do modelo Kossel está restringida ao crescimento a elevadas sobressaturações.

A maioria dos cristais apresenta dislocações que conduzem à formação de degraus nas faces e promovem o crescimento. A dislocação em parafuso tem um papel importante no crescimento do cristal, uma vez que evita a necessidade de nucleação à superfície. Após formada a dislocação em parafuso, a face do cristal pode crescer perpetuamente em espiral. A Figura 1.8 indica as sucessivas fases envolvidas no desenvolvimento de um crescimento em espiral iniciado a partir de uma dislocação em parafuso. A curvatura da espiral não pode exceder um dado valor máximo, determinado pelo raio crítico para núcleos bidimensionais em condições de sobressaturação no meio em que o cristal está a crescer.

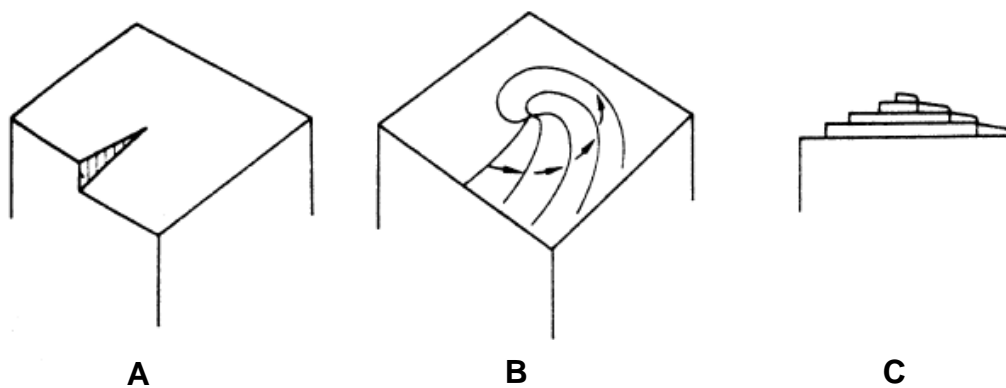


Figura 1.8: Desenvolvimento de um crescimento em espiral iniciado de uma dislocação em parafuso (Mullin, 2001).

Uma vez que uma face totalmente lisa nunca surge em condições de crescimento em espiral, a nucleação de superfície não é necessária e o cristal cresce como se a superfície fosse coberta por *kinks*. O crescimento continua sem interrupções até próximo da velocidade teórica máxima para um dado nível de sobressaturação. O comportamento de uma face de cristal com muitas dislocações é praticamente o mesmo de uma face do cristal contendo apenas uma (Mullin, 2001).

Em 2007, Martins e Rocha desenvolveram um modelo de crescimento cristalino, denominado *spiral nucleation model* (SNM). Com base em fundamentos de nucleação bidimensional e de crescimento em espiral, este modelo explora a relação entre a velocidade de crescimento do cristal com os parâmetros principais do processo, tais como, a sobressaturação, a temperatura, o tamanho do cristal, a topologia de superfície e as propriedades interfaciais (Martins & Rocha, 2007).

1.3.2 Crescimento cristalino em proteínas

Os cristais de proteína crescem por mecanismos similares aos existentes em cristais de materiais inorgânicos, embora as velocidades sejam muito diferentes. O crescimento de cristais de proteínas em solução ocorre por adição sequencial de camadas. Tal como ilustrado na Figura 1.9, a adição de camadas à superfície realiza-se por meio de dois processos denominados: crescimento tangencial e normal à face. O crescimento normal à superfície surge da formação de novas camadas ou de unidades de crescimento que apresentam arestas no degrau onde novas moléculas podem aderir tangencialmente. O crescimento tangencial contribui para a extensão lateral das camadas superficiais.

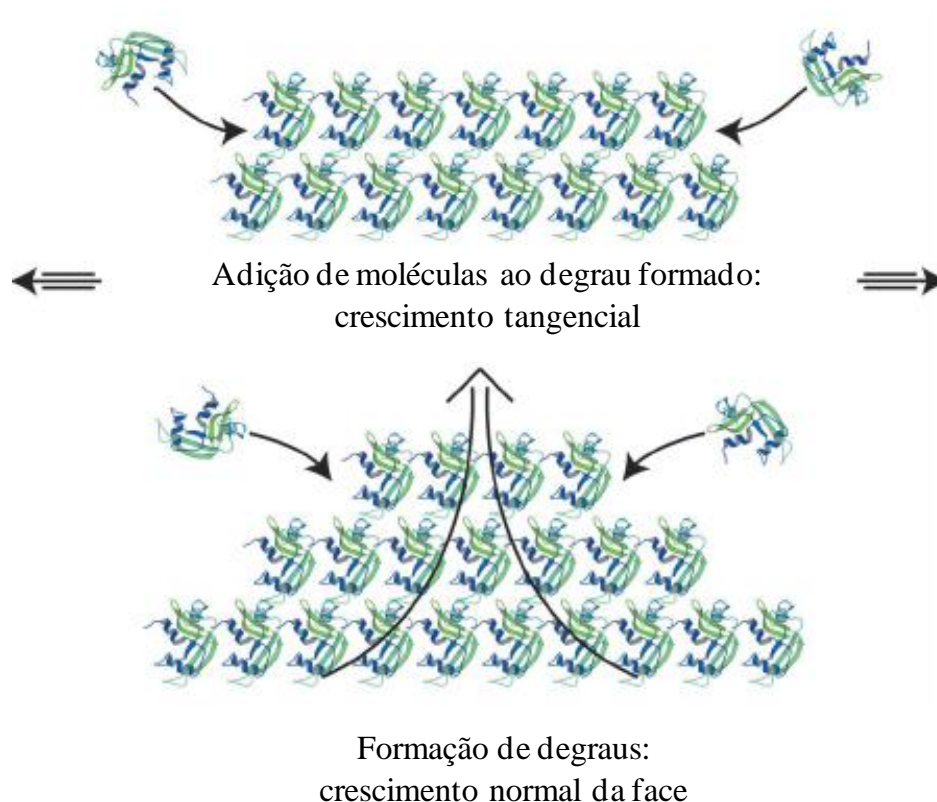


Figura 1.9: Representação esquemática do crescimento tangencial e normal à face (McPherson & Kuznetsov, 2014).

A adição de camadas na direção normal à face contribui para formação de degraus e crescimento dos mesmos por nucleação bidimensional e/ou dislocação em parafuso, os principais mecanismos de crescimento de cristais de proteína (McPherson

et al., 2003; Plomp et al., 2003; Sazaki et al., 2005; Van et al., 2007). Estes mecanismos dão origem a superfícies peculiares, exemplificadas na Figura 1.10.

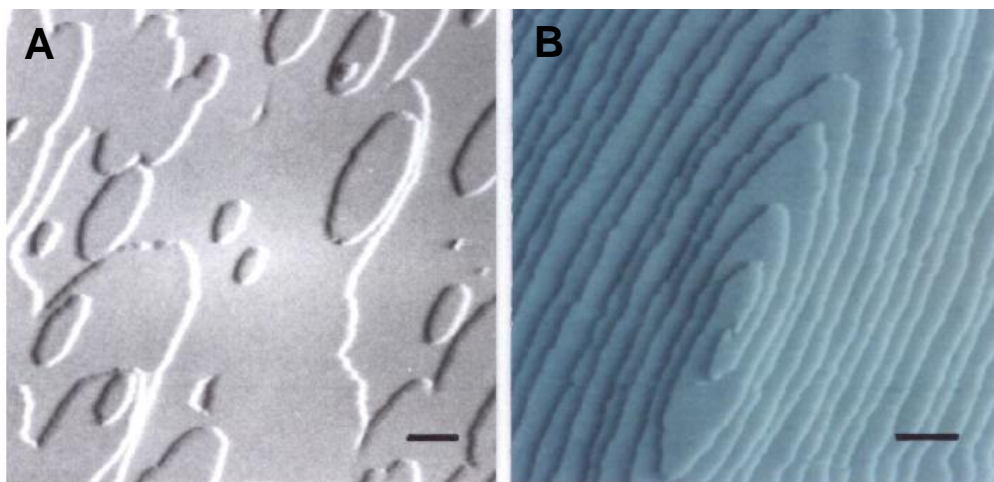


Figura 1.10: Micrográfico de força atômica de cristais de lisozima em crescimento por diferentes mecanismos. A) Nucleação bidimensional. B) Dislocação em parafuso. A barra de escala em μm (Durbin & Feher, 1996).

Nucleação bidimensional: Para uma larga gama de sobressaturações, os cristais de proteínas formam degraus e novas camadas de crescimento por um processo de nucleação bidimensional nas superfícies existentes. As moléculas, oriundas da solução, aderem à superfície e organizam-se formando agregados ou núcleos. Quando atingem o tamanho crítico, o crescimento torna-se termodinamicamente favorável e expande-se por adição de novas moléculas nas arestas do degrau. Os cristais que crescem pelo processo de nucleação bidimensional apresentam, geralmente, inúmeras unidades de crescimento dispersas pelas suas superfícies. As impurezas, que também afetam a velocidade de propagação do degrau, são incorporadas por diferentes afinidades em torno das unidades de crescimento, logo irão influenciar a velocidade de incorporação/adição de moléculas de soluto, conduzindo a formas assimétricas para as unidades de crescimento.

Dislocação em parafuso: A existência de um defeito na estrutura do cristal cria uma aresta na camada a partir da qual ocorrerá crescimento. As dislocações em parafuso surgem quando na incorporação de uma impureza ou na incorporação de uma ou mais moléculas, ocorre um crescimento ao longo da direção normal à superfície. Nesses locais, os degraus vão se propagar como múltiplas camadas em espiral sobre a dislocação, formando a dislocação em parafuso (ver Figura 1.10B). Este mecanismo, ao

contrário da nucleação bidimensional, pode ser ativado a baixas sobressaturações porque não é necessário a existência de uma etapa de nucleação para iniciar uma nova camada. A formação contínua de arestas superficiais a partir de dislocações em parafuso proporciona novas camadas e o cristal cresce quase exclusivamente por adição tangencial de moléculas às arestas da camada (Durbin & Feher, 1996).

Também é de realçar que diferentes faces do mesmo cristal podem adotar simultaneamente diferentes mecanismos para desenvolvimento. Inclusive, a mesma face pode utilizar mais que um mecanismo ao mesmo tempo, e o tipo de mecanismo pode-se alterar com a mudança de determinadas variáveis experimentais, nomeadamente a temperatura (McPherson & Kuznetsov, 2014).

Para ocorrer crescimento normal à face, contrariamente ao crescimento tangencial, obriga o sistema a ultrapassar uma barreira energética. Por isso, o desenvolvimento de uma nova aresta, e respetiva camada, é a etapa mais lenta e difícil no crescimento cristalino, ou seja, é o passo limitante de crescimento do degrau e pode cessar mais cedo que o crescimento tangencial.

O crescimento cristalino é afetado pelo grau de sobressaturação da solução. Praticamente, todas as variáveis cinéticas e termodinâmicas estão dependentes da sobressaturação (Vekilov et al., 2002). Inclusive, o tipo de mecanismo de crescimento adotado na superfície cristalina é influenciado pela sobressaturação. A sobressaturação, por sua vez, depende de um conjunto de variáveis experimentais, tais como: concentração de precipitante, concentração de proteína, temperatura, pH ou outros fatores físicos e químicos. Também, propriedades dinâmicas, conformacionais, químicas e físicas das proteínas, e a forma como interagem umas com as outras, podem afetar a sobressaturação (McPherson, 2004).

1.4 Efeito das impurezas na cinética de cristalização

O crescimento cristalino pode ser afetado profundamente por impurezas presentes no sistema. A maior parte das impurezas suprimem o crescimento, algumas impurezas promovem-no, outras bloqueiam completamente o crescimento mesmo em quantidades vestigiais. Uma vez que as impurezas atuam usualmente em determinadas faces cristalográficas, podem ser usadas para alterar a forma de crescimento dos cristais. O efeito de impurezas no crescimento cristalino é diversificado pois depende de vários fatores: sobressaturação, temperatura, concentração de impureza e sua natureza, o tipo de sistema em questão, entre outros.

Num meio contaminado por impurezas, a cinética de crescimento de um cristal em função da sobressaturação pode apresentar diferentes tendências. Para o mesmo valor de concentração, algumas impurezas retardam a velocidade de crescimento da face do cristal enquanto que outras conduzem ao seu aumento. O mesmo comportamento observa-se no caso das velocidades de deslocamento de degraus numa face de cristais em função de sobressaturação σ .

A face cristalina em crescimento é constituída por degraus que podem ou não conter *kinks* (ver Figura 1.7). Assim como no caso da integração de moléculas de soluto, os *kinks* e os degraus são zonas preferenciais para adesão de partículas de impurezas presentes na superfície. A Figura 1.11 apresenta esquematicamente os locais de adsorção de impurezas na face cristalina.

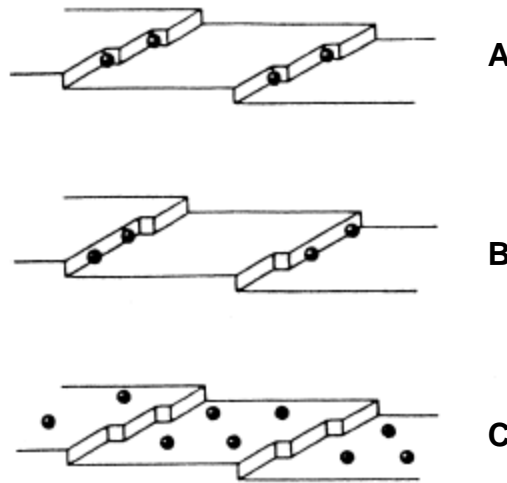


Figura 1.11: Representação esquemática dos locais de adsorção de impurezas: A) *kinks*, B) no degrau e C) no terraço da face cristalina (Sangwal, 2007).

No estudo do efeito das impurezas na cinética de crescimento, é apropriado considerar o parâmetro θ que caracteriza a cobertura dos locais da superfície disponíveis para adsorção. Para tal, assume-se que a adsorção de moléculas de impurezas está limitada à camada existente nas imediações da superfície do cristal, e que não ocorre interações verticais nem horizontais entre as moléculas de impurezas adsorvidas.

O número de locais disponíveis para adsorção por unidade de área de superfície, n_{max} , é assumido constante, e que para uma dada concentração de impurezas, uma fração θ de locais disponíveis para adsorção estão ocupados por impurezas.

Se para uma dada concentração de impurezas, o número de locais de adsorção ocupados for n_{ad} (por unidade de área e a uma dada temperatura), então a taxa de cobertura de locais de adsorção θ é dada por:

$$\theta = \frac{n_{ad}}{n_{max}} \quad (1.18)$$

Na ausência de impurezas, $n_{ad} = 0$ e $\theta = 0$. Com o aumento na concentração de impurezas, θ aumenta até $\theta = 1$, quando todos os locais de adsorção estão ocupados.

Quando existem interações verticais e horizontais entre moléculas de impurezas adsorvidas, as partículas de impurezas formam pares, trímeros e agregados de grandes dimensões em torno de determinados locais de adsorção. Neste caso, dependendo da concentração de partículas de impurezas adsorvidas em possíveis locais de adsorção, n_{ad} pode ultrapassar o n_{max} e $\theta > 1$, conduzindo à formação de uma camada bidimensional de impurezas adsorvidas. Assim, com o aumento da concentração de impurezas temos duas situações denominadas: $\theta < 1$ e $\theta > 1$. Normalmente, uma pequena quantidade de impureza é suficiente para alterar o hábito de crescimento e a cinética de crescimento dos cristais. Logo, para baixas concentrações de impurezas $\theta < 1$ (Sangwal, 2007).

1.4.1 Modelos cinéticos de adsorção de impurezas em estado estacionário

1.4.1.1 Modelo Kubota-Mullin

Há mais de cinco décadas que o mecanismo de crescimento cristalino na presença de impurezas tem vindo a ser estudado, conjugando dados experimentais com modelos matemáticos. Em 1958, os investigadores Cabrera e Vermilyea (C-V) desenvolveram o mecanismo *pinning* para explicar a ação de impurezas no avanço dos degraus. Estes autores assumem que as impurezas são adsorvidas em locais preferenciais à superfície do cristal (*kinks*). O deslocamento do degrau é interrompido por impurezas adsorvidas e o degrau é obrigado a curvar, conforme exemplificado no esquema da Figura 1.12. Considera-se que as impurezas estão adsorvidas nos locais ativos existentes nas extremidades do degrau e retardam o avanço dos degraus.

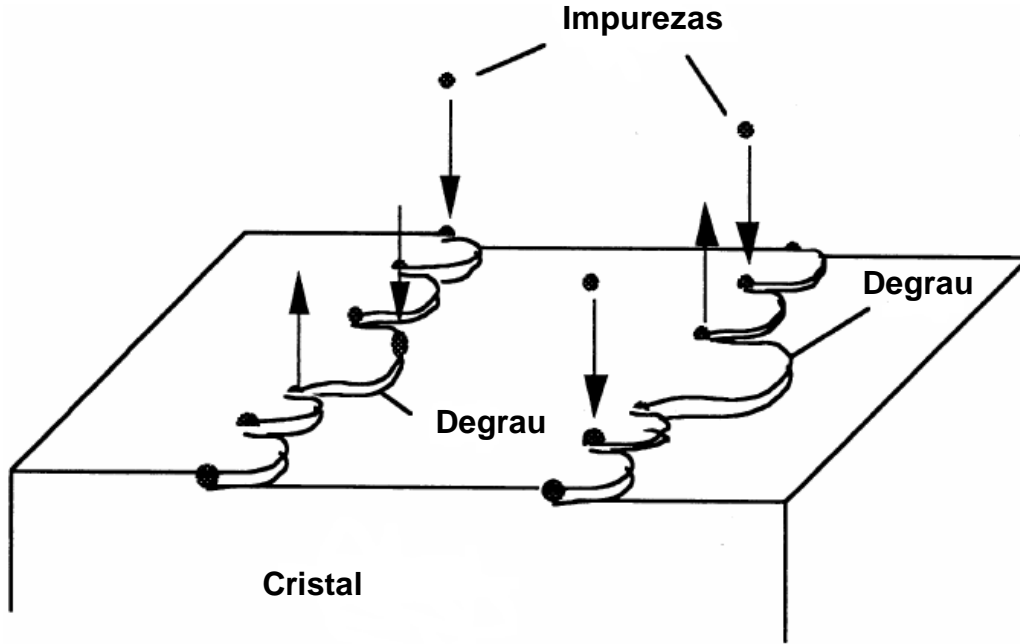


Figura 1.12: Modelo de adsorção de impurezas (Kubota, 2001a).

Se a distância média entre impurezas adsorvidas ao longo do degrau for menor que duas vezes o raio crítico para nucleação bidimensional ($l < 2\rho_c$), o degrau irá parar de avançar. A relação entre a velocidade de avanço (v_ρ) do degrau e o raio de curvatura é dada pela equação 1.19, denominada fórmula de Gibbs-Thomson:

$$\frac{v_\rho}{v_\infty} = 1 - \frac{\rho_c}{\rho} \quad (1.19)$$

Onde v_∞ representa o movimento de um degrau em linha reta (unidirecional). A baixas sobressaturações ($\sigma \ll 1$), ρ_c é dado por:

$$\rho_c = \frac{\gamma\Omega}{kT\sigma} \quad (1.20)$$

Onde γ é a energia livre da aresta, Ω é o volume específico e σ é a sobressaturação, definida como $c/c^* - 1$.

Na equação 1.19, se $\rho = l/2$ então atinge-se a velocidade mínima do degrau (v_{min}). Cabrera e Vermilyea assumiram que a velocidade média do degrau durante o período de

ocorrência do processo *pinning* é calculada por média geométrica de v_∞ e v_{min} ($v = \sqrt{v_\infty v_{min}}$), obtendo-se:

$$\frac{v}{v_\infty} = \sqrt{1 - 2 \frac{\rho_c}{l}} \quad (1.21)$$

Recentemente, Kubota e Mullin recorreram a uma média aritmética para descrever v ($v = (v_\infty + v_{min})/2$). Neste caso,

$$\frac{v}{v_\infty} = 1 - \frac{\rho_c}{l} \quad (1.22)$$

sendo $l \geq \rho_c$

Considerando que o raio da curvatura dos degraus em sistemas puros é infinito ($v_\infty = v_0$), a expressão para velocidade do degrau na presença de impurezas foi derivada da seguinte forma:

$$v/v_0 = 1 - \theta_l \quad (1.23)$$

Sendo v_0 a velocidade do degrau num sistema puro e θ_l é a fração da superfície ocupada por impurezas adsorvidas.

Em termos geométricos simples, os locais adsorvidos por impurezas em equilíbrio (θ_l) correspondem à razão entre distância média entre locais ativos e a distância média entre impurezas adsorvidas vizinhas, $\theta_l = L/l$. Esta fração é comumente apresentada por uma isotérmica de Langmuir:

$$\theta_l = \frac{K_i c_i}{K_i c_i + 1} \quad (1.24)$$

Onde c_i é a concentração de impurezas e K_i é a constante de Langmuir.

A velocidade relativa assume valor nulo quando θ_l é igual a 1. Contudo, não é necessário ocorrer adsorção completa ou uma cobertura total da superfície para existir interrupção do crescimento do cristal pois uma dada impureza adsorve apenas em locais específicos por ação de uma força de adsorção específica, em especial nos casos de adsorção química. Assim, neste contexto, os termos adsorção completa ou cobertura total referem-se à ocupação completa de locais específicos disponíveis para adsorção. Os locais disponíveis para adsorção podem ser diferentes com a combinação do cristal em crescimento e da impureza. O número de locais ativos varia com cada combinação. Se o número de locais ativos é muito limitado, as impurezas adsorvidas estão consideravelmente afastadas umas das outras, mesmo quando θ_l é igual a 1 (cobertura total). Nestas condições, a impureza pode não interromper o avanço do degrau tal como indicado no modelo de Cabrera-Vermilyea, isto é, o degrau pode facilmente progredir no espaço existente entre as impurezas (Cabrera & Vermilyea, 1958). Além disso, existem diferentes tipos de impurezas ativas: macromoléculas, componentes orgânicos, iões metálicos, entre outros. A supressão de crescimento causada pela ação da impureza depende de determinadas características da mesma, nomeadamente, o tamanho, a forma ou a orientação das moléculas de impureza (um efeito estereoquímico). Assim, a determinação da eficácia de uma impureza num cristal em crescimento deve levar em consideração dois parâmetros: a fração de adsorção (θ_l) e o fator de eficácia (α). A próxima equação leva em conta estes dois fatores:

$$v/v_0 = 1 - \alpha \frac{K_i c_i}{K_i c_i + 1} \quad (1.25)$$

Quando $\alpha > 1$, a velocidade do degrau se aproxima de zero a $\theta_l < 1$ (cobertura incompleta). Quando $\alpha = 1$, a velocidade é nula apenas se $\theta_l = 1$ (cobertura completa), e quando $\alpha < 1$, a velocidade nunca atinge o valor zero mesmo se $\theta_l = 1$.

Assumindo que a velocidade relativa do degrau é proporcional à velocidade relativa de crescimento da face G/G_0 , então v/v_0 na equação 1.25 pode ser substituída por G/G_0 :

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha \frac{K_i c_i}{K_i c_i + 1} \quad (1.26)$$

Sendo α definido como:

$$\alpha = \frac{\gamma\Omega}{kTL\sigma} \quad (1.27)$$

De acordo com o valor de α , as impurezas adsorvidas na mesma extensão podem atuar de forma diferente na cinética de crescimento. Na Figura 1.13, as velocidades relativas de degrau, calculadas a partir da equação 1.25 são apresentadas para diferentes valores de α como uma função da forma adimensional da concentração de impureza $K_i c_i$.

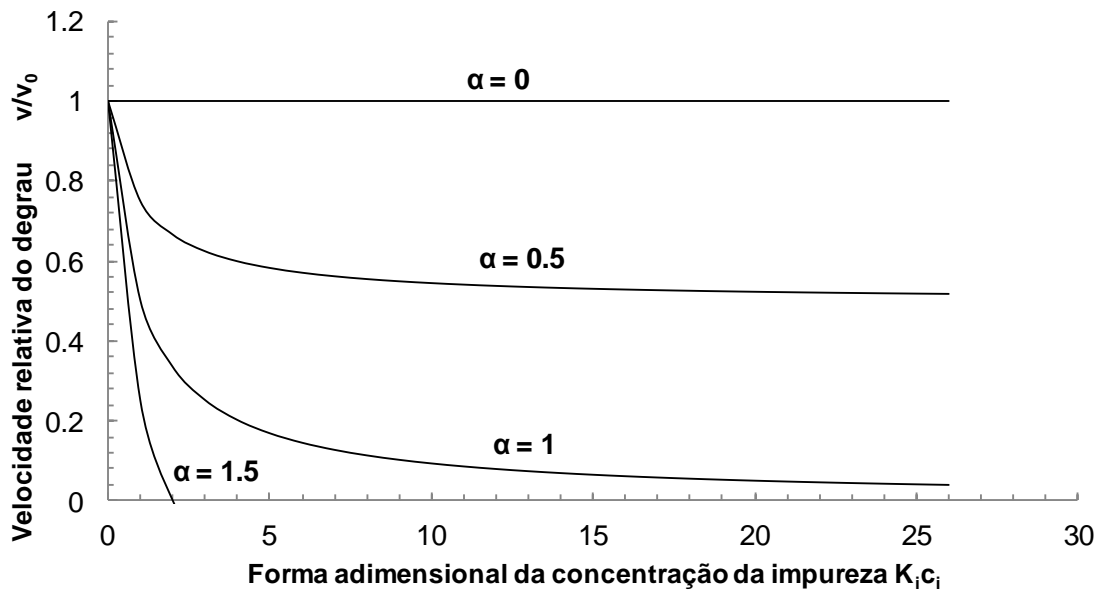


Figura 1.13: Relação teórica entre a velocidade relativa do degrau v/v_0 e a forma adimensional da concentração de impureza para diferentes valores de α .

Quando $\alpha > 1$, a velocidade relativa diminui drasticamente (aproximadamente linear) com o aumento da concentração de impureza, podendo anular-se mesmo para baixos valores de $K_i c_i$. Para $\alpha = 1$, a velocidade do degrau tende assintotamente para zero. Para $\alpha < 1$, a velocidade tende assintotamente para um valor diferente de zero à medida que $K_i c_i$ aumenta. Estes três tipos de comportamentos teóricos que descrevem a influência das impurezas na velocidade do degrau, podem ser observados em sistemas reportados na literatura (Kubota & Mullin, 1995).

1.4.1.2 Modelo de adsorção competitiva (CAM)

No modelo de adsorção competitiva (competitive adsorption model-CAM), o crescimento cristalino na presença de impurezas é visto como uma competição entre moléculas de soluto e partículas externas para locais preferenciais de adsorção. Os fatores que determinam o sucesso de cada tipo de molécula estão relacionados com as suas concentrações, mobilidade e afinidade físico-químicas com a superfície do cristal. Quando se considera a isotérmica de Langmuir para definir θ_l , assume-se que este parâmetro é apenas dependente da concentração de impurezas. Contudo, esta hipótese não é válida uma vez que o número de locais ativos ocupados por impurezas diminui com o aumento da sobressaturação. Para sobressaturações elevadas, todos os locais ativos serão ocupados por soluto, e $\theta_l \sim 0$. O modelo CAM explica o mecanismo de adsorção de impurezas diferindo do mecanismo *pinning* proposto por Cabrera-Vermilyea (Cabrera & Vermilyea, 1958) e desenvolvido por Kubota e Mullin (Kubota, 2001b). As descobertas em microscopia de força atómica contradizem a fórmula de Gibbs-Thomson, na qual se baseia o mecanismo *pinning*, impondo assim a necessidade de reconsiderar o modelo cinético de crescimento na presença de impurezas (Chernov, 2004; Rashkovich et al., 2001; Teng, 1998). Em vez de um aumento gradual de v com ρ , ocorre um aumento abrupto de v quando o degrau ultrapassa a dimensão crítica (ρ_c). O modelo CAM foca-se nos efeitos das impurezas na cinética e não nas alterações das propriedades do soluto provocados pela impureza.

Como referido, no crescimento cristalino em soluções impuras os locais de adsorção são disputados tanto por impurezas como por soluto. No equilíbrio, a fração da superfície ocupada por impurezas é dada pela isotérmica de Langmuir aplicada à adsorção competitiva:

$$\theta_s = \frac{K_i c_i}{K_i c_i + K c + 1} \quad (1.28)$$

Expressando esta equação em função da sobressaturação ($\sigma = c/c^* - 1$) obtém-se:

$$\theta_s = \frac{k_i c_i}{k_i c_i + k \sigma + 1} \quad (1.29)$$

Onde $k_i = K_i/(1 + Kc^*)$ e $k = Kc^*/(1 + Kc^*)$. Espera-se que a superfície coberta por impurezas seja reduzida ($\theta_s \ll 1$) quando a concentração na forma adimensional, $k_i c_i$, é também baixa. Mesmo nos casos de pouca adsorção de impurezas, as velocidades de crescimento cristalino podem ser afetadas drasticamente pelas impurezas. Este fenómeno poderá estar associado ao mecanismo de integração à superfície, e em particular, com a mobilidade de diferentes moléculas à superfície.

De acordo com o modelo Kossel, durante o crescimento na face cristalina em soluções puras, as moléculas que chegam a uma superfície perto dum degrau podem ser facilmente adsorvidas, difundir ao longo da superfície, e encontrar um local energeticamente favorável (*kink*) para integração. No caso do crescimento do cristal em solução impura, o efeito de impurezas na cinética envolve 3 estágios análogos:

- (1) Adsorção à superfície de moléculas de impurezas que se difundiram da solução.
- (2) Migração de moléculas de impurezas ao longo da superfície.
- (3) Adsorção de moléculas de impureza nos degraus/*kinks*.

Em cada um destes estágios existe alterações termodinâmicas associadas, cujos valores relativos determinam se ocorrerá adsorção e como se dará. A fração de locais ativos ocupados por impurezas (θ_l) será proporcional à fração da superfície coberta por impurezas (θ_s):

$$\theta_l = \beta \theta_s \quad (1.30)$$

O parâmetro β assume valores mais elevados quando os estágios (2) e (3) são termodinamicamente favoráveis em relação ao estágio (1). Para impurezas com elevada mobilidade, β é muito superior a 1, ou seja, as impurezas concentram-se principalmente nos locais preferenciais para adsorção. Por outro lado, no caso de adsorção favorável à superfície e de baixa mobilidade das impurezas adsorvidas, é espectável que β assumam valores positivos e pequenos. A densidade de moléculas de soluto adsorvidas à superfície (n_s) tende a diminuir até atingir a concentração de equilíbrio, n_{se} .

A razão entre velocidades de crescimento em solução impura e pura é dada pela seguinte equação:

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \theta_l \quad (1.31)$$

Em que, de acordo com as equações 1.24 e 1.25, pode ser reescrita como:

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \beta \frac{k_i c_i}{k_i + k\sigma + 1} \quad (1.32)$$

A equação 1.27 salienta novas perspectivas acerca do papel de variáveis importantes no crescimento cristalino em soluções impuras, tais como: sobressaturação, concentração de impurezas, temperatura, mobilidade à superfície, entre outras. O modelo CAM reconcilia a teoria do crescimento cristalino em soluções impuras com as novas descobertas em técnicas de microscopia (Martins et al., 2006).

1.4.2 Modelos cinéticos de adsorção de impurezas em estado não estacionário

1.4.2.1 Modelo K-MUS

Nem sempre a adsorção de impurezas ocorre até que se atinja o equilíbrio termodinâmico. Em alguns casos, o processo de adsorção não é instantâneo, ocorre lentamente. Nestas circunstâncias, a adsorção de impurezas decorre em estado não estacionário. Neste campo, os investigadores Kubota e Mullin estenderam o seu modelo ao caso de adsorção de impurezas em não-equilíbrio (K-MUS). A fração de superfície coberta por impurezas pode ser descrita em função do tempo t à luz de um mecanismo tipo-Langmuir:

$$\theta = \theta_l [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (1.33)$$

Onde τ é a constante de tempo de adsorção, uma função das constantes de velocidade de adsorção k_1 e dessorção k_{-1} , e da concentração de impurezas c_i : $\tau = (k_1 c_i + k_{-1})^{-1}$.

Inserindo a equação 1.33 na equação 1.25, obtém-se a variação da velocidade de crescimento relativa G/G_0 com o tempo:

$$G/G_0 = 1 - \alpha \theta_i [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (1.34)$$

De acordo com o modelo K-MUS, a velocidade de crescimento cristalino diminui com o tempo devido ao progressivo envenenamento do cristal. A equação 1.34 mostra que a diminuição da velocidade de crescimento é mais lenta para valores mais elevados da constante de tempo, τ (Kubota, 2001a).

1.4.2.2 Modelo CAMUS

O modelo CAMUS (*Competitive Adsorption Model Unsteady State*) (Martins et al., 2011), desenvolvido mais recentemente, é capaz de explicar comportamentos de inibição progressiva de crescimento cristalino não esperados pelas teorias existentes. Estes fenómenos incluem o crescimento cristalino intermitente, aumento de velocidade de crescimento com o tempo a sobressaturação constante, e curvas de velocidades de crescimento apresentando valores máximos para níveis intermédios de sobressaturação.

A equação 1.27 do CAM foi derivada assumindo que a adsorção em equilíbrio é estabelecida instantaneamente. Em muitas situações esta aproximação é razoável, no entanto, em alguns casos, as velocidades de crescimento cristalino em estado estacionário são apenas atingidas depois de passado um determinado período de tempo quando na presença de impurezas. Durante esse período, o soluto e as impurezas adsorvem na superfície do cristal seguindo cinéticas competitivas. O parâmetro θ_j representa a ocupação instantânea da superfície, com j a tomar os valores 1 ou 2 consoante se refira ao soluto ou às impurezas, respetivamente. Com base no mecanismo de Langmuir para adsorção não competitiva, a velocidade de adsorção pode ser descrita como a diferença entre velocidades de adsorção e dessorção:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\theta_1}{dt} = k_1\sigma(1 - \theta_1 - \theta_2) - k_{-1}\theta_1 \\ \frac{d\theta_2}{dt} = k_2c_i(1 - \theta_1 - \theta_2) - k_{-2}\theta_2 \end{array} \right. \quad (1.35)$$

As velocidades de adsorção instantânea são proporcionais à fração de superfície não ocupada por moléculas adsorvidas ($1 - \theta_1 - \theta_2$) e ao fluxo total que chega à superfície, que na equação 1.35 é expresso em função da sobressaturação σ do soluto, e da concentração de impurezas c_i ; as velocidades de dessorção instantâneas são proporcionais à fração adsorvida de cada espécie química θ_j . As constantes de velocidade de adsorção e dessorção competitiva são representados por k_j e k_{-j} , respetivamente. No equilíbrio, a velocidade de adsorção de cada componente é nula e a ocupação fracional por impurezas θ_{2e} assume o valor de θ_s previamente definida na equação 1.29, com K_i correspondendo a k_2/k_{-2} e K correspondendo a k_1/k_{-1} . A evolução da adsorção à superfície com o tempo $\theta_j(t)$ é obtida a partir da solução do sistema de equações diferenciais dado pela equação 1.35 para condições iniciais de $\theta_j = 0$ e $t = 0$. Se a relação entre a quantidade de impurezas adsorvidas na superfície e nos locais ativos para crescimento for admitida constante com o tempo, então o parâmetro β também é constante e a variação da velocidade de crescimento cristalino segue diretamente a partir da equação 1.31:

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \beta\theta_2(t) \quad (1.36)$$

De acordo com esta equação, nos perfis de $\theta_2(t)$ existem variações de velocidades de crescimento com o tempo que se tornam mais pronunciados à medida que as impurezas são mais ativas (valor de β mais elevados).

A Figura 1.14 mostra 3 possíveis cenários esperados pelo CAMUS simulados assumindo que o nível de sobressaturação e de concentração de impurezas permanecem constantes.

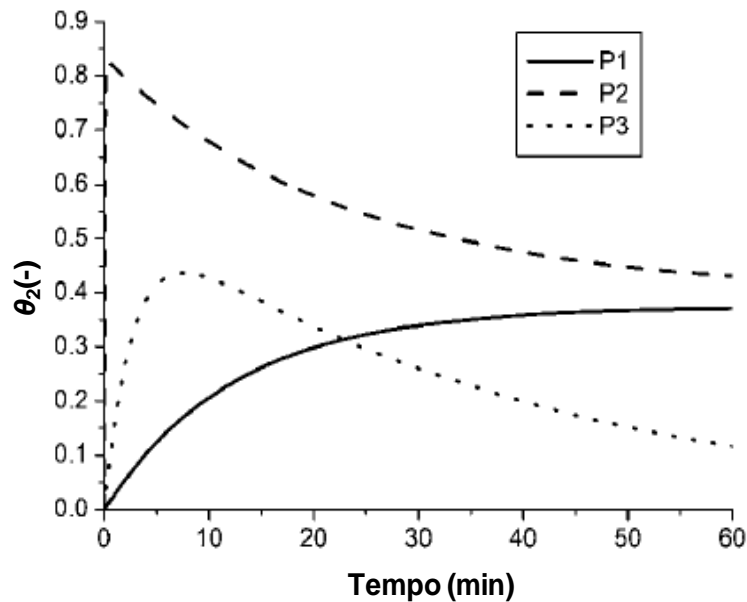


Figura 1.14: O perfil 1 (P1) corresponde ao comportamento convencional de adsorção em estado não estacionário, no qual a velocidade da adsorção de impurezas diminui com o tempo. Os perfis 2 e 3 (P2 e P3) não são explicados pelos mecanismos *pinning*.

O perfil P1 na Figura 1.14 é um exemplo típico do envenenamento progressivo das faces do cristal até se atingir o estado estacionário. No perfil do tipo P2, as impurezas adsorvem quase instantaneamente à superfície do cristal e depois são substituídas gradualmente por moléculas de soluto adsorvidas. No perfil P3, existe uma fase inicial de contaminação da superfície até atingir um valor máximo de θ_2 e depois as impurezas são dessorvidas lentamente à medida que θ_2 tende para zero.

1.5 Fenómeno de histerese no crescimento cristalino

A histerese é um fenômeno que pode ocorrer durante o crescimento cristalino na presença de impurezas, quando se impõe variações de sobressaturação. Nestes casos, dependendo da direção de variação da sobressaturação (diminuição ou aumento),

observam-se duas velocidades de crescimento distintas para uma mesma sobressaturação.

A histerese ocorre em processos de adsorção lenta, ou seja, adsorção em estado não estacionário. Em ensaios de histerese, o sobrearrefecimento varia continuamente a uma velocidade constante por alteração da temperatura T duma dada solução. O sobrearrefecimento, ΔT , dado pela diferença entre a temperatura de saturação T_e e a temperatura de solução, está diretamente relacionado com o nível de sobressaturação (Kubota et al., 2003):

$$\sigma \cong \frac{T_e - T}{T} = \frac{\Delta T}{T} \quad (1.37)$$

A partir das equações 1.27 e 1.37, o fator de eficácia da impureza pode ser reescrito sob a forma:

$$\alpha = \frac{\gamma \Omega}{k \Delta T L} \quad (1.38)$$

Substituindo a equação 1.38 na 1.26, obtém-se:

$$G = \frac{G_0}{\Delta T} (\Delta T - \Delta T_c) \quad (1.39)$$

Sendo $\Delta T \geq \Delta T_c$, onde ΔT_c é o sobrearrefecimento crítico para qual $G = 0$, ou seja:

$$\Delta T_c = \frac{\gamma a}{k L} \theta_e \quad (1.40)$$

Para evidenciar a dependência do sobrearrefecimento, a velocidade de crescimento de uma dada face na presença de impurezas pode ser escrita na forma adimensional substituindo G_0 por $g_0(\Delta T)$:

$$\frac{G}{g_0(\Delta T_c)} = \frac{g_0(\Delta T)}{g_0(\Delta T_c)} \left(\frac{\Delta T}{\Delta T_c} \right)^{-1} \left(\frac{\Delta T}{\Delta T_c} - 1 \right) \quad (1.41)$$

Onde $g_0(\Delta T)$ é a velocidade de crescimento da face do cristal em solução na ausência de impurezas e $\frac{\Delta T}{\Delta T_c} \geq 1$.

Em estado não estacionário, as velocidades de crescimento normalizadas podem ser descritas em função de sobreaquecimento ΔT e do tempo t . Considerando uma cinética de 2ª ordem, $g_0(\Delta T) = k_G(\Delta T)^2$, obtém-se:

$$\frac{G}{k_G(\Delta T_c)^2} = \left(\frac{\Delta T}{\Delta T_c} \right) \left\{ \frac{\Delta T}{\Delta T_c} - \left[1 - \exp \left(\frac{-t}{\tau} \right) \right] \right\} \quad (1.42)$$

Sendo k_G a constante de velocidade e $\frac{\Delta T}{\Delta T_c} \geq 1 - \exp \left(\frac{-t}{\tau} \right)$. Assume-se que τ (constante de tempo) não depende de sobreaquecimento e da temperatura. Isto diz respeito à Figura 1.15:

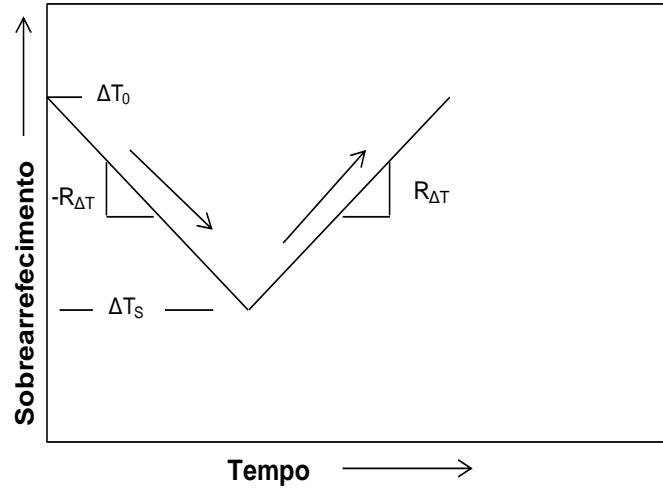


Figura 1.15: Variação do sobreaquecimento ao longo do ensaio experimental (Kubota et al., 2003)

O crescimento de um cristal pode iniciar-se a um valor de sobreaquecimento elevado ΔT_0 que vai diminuindo ao longo do tempo, a uma velocidade constante $R_{\Delta T}$. A relação entre decréscimo do sobreaquecimento (aumento da temperatura) e o tempo do ensaio experimental é descrita da seguinte forma:

$$t = \frac{(\Delta T_0 - \Delta T_s)}{R_{\Delta T}} \quad (1.43)$$

O sobrearrefecimento diminui até atingir um valor ΔT_s , no qual o cristal pára de crescer. Na etapa de aumento de sobrearrefecimento (diminuição de temperatura), obtém-se a seguinte relação:

$$t = \frac{(\Delta T_0 - \Delta T_s) + (\Delta T - \Delta T_s)}{R_{\Delta T}} = \frac{\Delta T - 2\Delta T_s - \Delta T_0}{R_{\Delta T}} \quad (1.44)$$

Nesta etapa, ΔT_s é o valor inicial de sobrearrefecimento.

Fenómenos de histerese na velocidade de crescimento do cristal podem ser identificados em ensaios compostos por uma etapa de aumento da temperatura (diminuição do sobrearrefecimento) seguida de diminuição de temperatura (aumento de sobrearrefecimento). A combinação da equação 1.42 com as equações 1.43 e 1.44, permite expressar a velocidade de crescimento do cristal em função do sobrearrefecimento (Kubota et al., 2003).

1.6 Dissolução

A dissolução de cristais é um processo importante na indústria farmacêutica. A cinética de dissolução assume um papel de relevo no estudo da biodisponibilidade de produtos farmacêuticos cristalinos, bem como no controlo de qualidade dos mesmos (Shan, 2002).

Recentemente, alguns investigadores (Bernardo et al., 2005; Oswald & Ulrich, 2015) descobriram que cristais de proteína podem adotar comportamentos atípicos em dissolução, impossíveis de descrever pelos mecanismos convencionais. Estes fatos vêm reforçar a necessidade de aprofundar os conhecimentos fundamentais do processo.

Assim, a compreensão dos mecanismos de dissolução de cristais de proteína não só possibilita um melhor controlo na cristalização de proteínas como também tem

aplicações práticas na avaliação da biodisponibilidade de fármacos (Oswald & Ulrich, 2015).

A dissolução de cristais, de forma análoga ao crescimento cristalino, depende fortemente de uma força diretriz termodinâmica, usualmente expressa em termos de sobressaturação, S . O processo de dissolução ocorre em soluções subsaturadas ($S < 1$). Nesta região, a dissolução dos cristais é contínua e total. A dissolução dos cristais será interrompida caso se atinja o equilíbrio ($S = 1$).

Com base na teoria clássica de nucleação, alguns investigadores (Krestov, 1991) sustentam a ideia que a dissolução é um processo de redução do tamanho do cristal que se inicia nas arestas e dislocações existentes no cristal. Sendo assim, à medida que o processo decorre, deverão diminuir a área interfacial sólido/solução, a energia de superfície (ΔG_s) e a energia de volume (ΔG_v). Deste modo, termodinamicamente, não existe nenhuma barreira energética para a dissolução, diferentemente da nucleação (Tang et al., 2004).

Cinética de dissolução

Na literatura são propostos diversos mecanismos para descrever a dissolução. O modelo *Noyes-Whitney* (Noyes & Whitney, 1897) foi o primeiro modelo proposto para investigar cinéticas de dissolução recorrendo a uma equação diferencial relacionando a velocidade de dissolução de sólidos (soluto) com a concentração de soluto dissolvida no solvente. O modelo *Noyes-Whitney* estabelece que a velocidade de dissolução é proporcional à diferença entre a concentração instantânea de soluto c ao instante t , e a concentração no equilíbrio c^* . Considerando a dissolução um processo controlado por difusão e isento de reações químicas, esta relação pode ser formulada matematicamente da seguinte forma:

$$\frac{dc}{dt} = k\Omega(c^* - c) \quad (1.45)$$

Onde k é a constante de dissolução, $k = D/\delta$, sendo D o coeficiente de difusão do soluto e δ a espessura da camada limite de difusão que depende da temperatura,

viscosidade do solvente, geometria da superfície em dissolução e agitação hidrodinâmica do solvente. O parâmetro Ω corresponde ao volume específico. Durante a dissolução, c aumenta sistematicamente até igualar o valor de c^* . Nesse instante, a força diretriz desaparece e o processo de dissolução é interrompido (Lobo & Costa, 2001; Dokoumetzidis & Macheras, 2006; Tonchev & Nanev, 2013).

Se considerássemos a dissolução e o crescimento cristalino processos controlados exclusivamente por difusão, seria espectável que, a uma dada temperatura e gradiente de concentração, as velocidades de dissolução e de crescimento fossem iguais. Inclusive, todas as faces de um cristal deveriam crescer e dissolver à mesma velocidade. Porém, de modo geral, constata-se que a dissolução é mais rápida que o crescimento cristalino, e em determinados casos, a velocidade de dissolução é o quádruplo da velocidade de crescimento. Embora na literatura existam poucos trabalhos que apoiam este comportamento, certos autores defendem que as faces cristalográficas que crescem a diferentes velocidades podem também dissolver a diferentes velocidades (Mullin, 2001).

Estudos de microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varrimento (MEV) revelaram que a presença de depressões na superfície cristalina determina o começo da dissolução (Tang et al., 2001). Quando se desenvolvem depressões numa superfície inicialmente lisa (ver Figura 1.16), criam-se locais ativos para a dissolução.

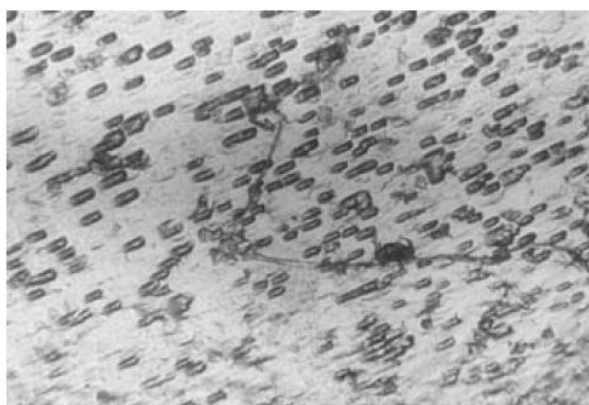


Figura 1.16: Imagem de um cristal de sacarose apresentando depressões na sua superfície no início da dissolução (Mullin, 2001).

Numa fase inicial da dissolução, o aumento da rugosidade da superfície conduz ao aumento da energia interfacial sólido-líquido. Assim, quando uma depressão atinge o tamanho crítico, a dissolução ocorre espontaneamente.

1.7 Variáveis que afetam a solubilidade das proteínas

Qualquer variável que afete a solubilidade da proteína pode ser usada para controlar a sobressaturação do sistema, e consequentemente, as velocidades de nucleação, crescimento e dissolução. A temperatura, a pressão e a composição da solução são variáveis termodinâmicas comumente usadas para alterar a solubilidade de proteínas. Do ponto de vista de um bioquímico, a forma mais apropriada de atingir a sobressaturação é alterando a composição, porém estudos recentes destacam a temperatura e a pressão como excelentes meios de controlo da sobressaturação (Ferreira et al., 2011; Myerson, 2002).

1.7.1 O efeito de iões

O efeito de iões na solubilidade de proteína é usualmente descrito como *salting-in* ou *salting-out*. A baixas concentrações de iões (<0.5 M), a solubilidade de proteína aumenta com a adição de iões, tal fenómeno é denominado *salting-in*. Este efeito pode ser explicado pelas interações eletrostáticas entre as moléculas de proteína carregadas eletricamente e as espécies iónicas (ver Figura 1.17). Os iões adicionados vão proteger as múltiplas cargas iónicas de proteína, enfraquecendo assim as forças de atração entre as moléculas de proteína (forças promotoras da agregação e cristalização). Este fenómeno pode também ser explicado pela teoria de Debye-Huckel para soluções iónicas. Segundo esta lei, um aumento da força iónica reduz a atividade dos iões em solução conduzindo assim ao aumento da solubilidade da proteína (Lee & Kim, 2003; Myerson, 2002).

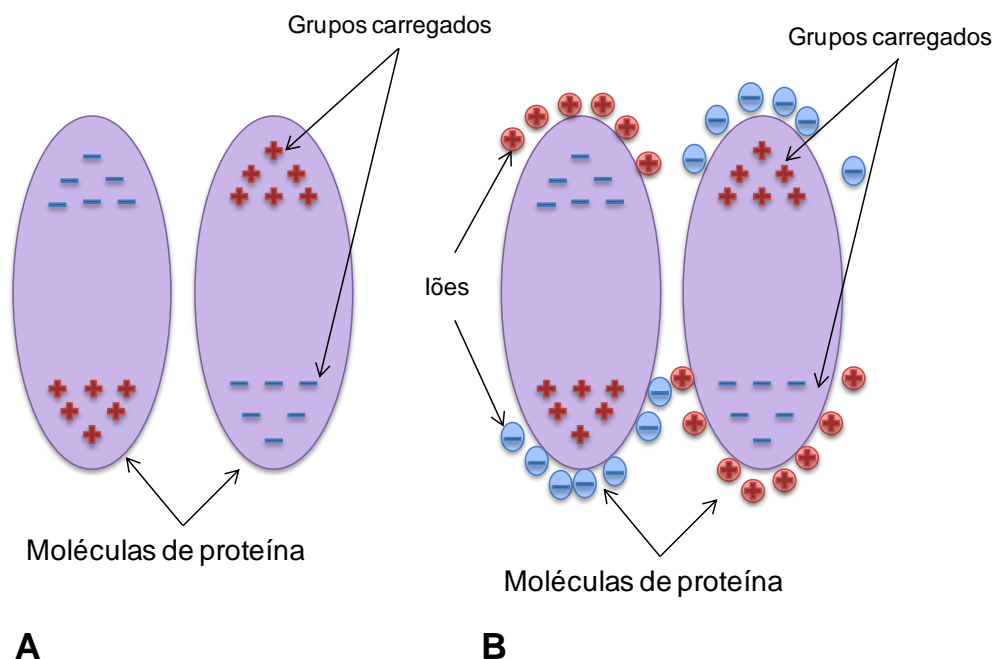


Figura 1.17: Fenômeno de *salting-in*. A) Na ausência de íons dissolvidos em solução, as moléculas de proteína vão estabelecer ligações por atração eletrostática entre os grupos carregados. B) Os íons blindam a interação eletrostática entre as macromoléculas, aumentando a solubilidade.

À medida que a força iônica aumenta, os íons adicionados competem entre eles e com as moléculas de proteína para estabelecer ligações com as moléculas de água circundantes. Quando as moléculas de proteína perdem ligações com as moléculas de água para as estabelecer com os íons, ocorre um aumento da concentração efetiva das espécies iônicas, e em consequência, uma diminuição da solubilidade (*salting-out*). No fenômeno de *salting-out*, a solubilidade da proteína é governada principalmente por efeitos hidrofóbicos.

Em suma, a baixas concentrações de íons, predominam as interações eletrostáticas que conduzem ao aumento da solubilidade de proteína (*salting-in*). Por outro lado, a elevadas concentrações de íons prevalecem os efeitos hidrofóbicos que causam a diminuição da solubilidade de proteína (*salting-out*), conforme mostrado na Figura 1.18. Isto é expresso pela seguinte expressão:

$$\log c^* = \log c_0^* + k_i c^{1/2} - k_0 c \quad (1.46)$$

onde k_i e k_o são as constantes de *salting-in* e *salting-out*, respectivamente; c_0^* é a solubilidade da proteína em água pura; e c a concentração molar de íons (Myerson, 2002).

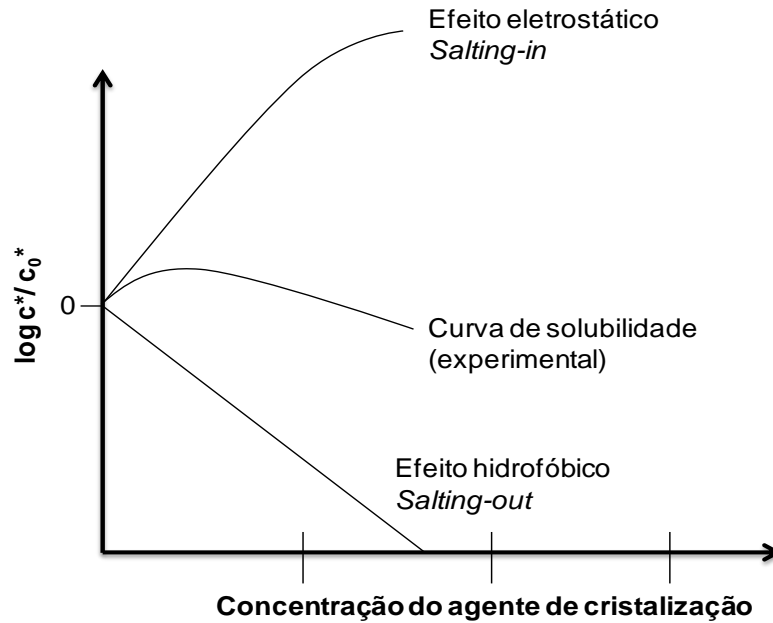


Figura 1.18 Contribuição dos efeitos eletrostático e hidrofóbico sobre a solubilidade c^* , normalizada em relação à solubilidade em água pura c_0^* (Lee & Kim, 2003).

1.7.2 O efeito da temperatura

De acordo com a literatura (Myerson, 2002), as proteínas são capazes de cristalizar a diferentes temperaturas, tanto à temperatura ambiente (25 °C) como a frio (4 °C). Contudo, o fato das proteínas, na sua maioria, desnaturarem a temperaturas superiores a 40 °C condiciona a gama de temperaturas das condições operatórias (0 a 40 °C). E, nesta gama de temperaturas o cristal de proteína pode sofrer fases de transição (Heijna et al., 2008; Aldabaibeh et al., 2009; Yu et al., 2015).

A temperatura do sistema pode influenciar a solubilidade da proteína, em especial nas soluções de baixa força iônica (Mcpherson, 1989; Myerson, 2002). A termodinâmica clássica descreve o efeito da temperatura na solubilidade de uma molécula em solução. Quando a entalpia de cristalização, ΔH_{cris} e a solubilidade (c_1^*) a uma dada temperatura de referência (T_1) são conhecidas, a solubilidade pode ser

expressa em função da temperatura com base na equação de *van't Hoff* (Myerson, 2002):

$$\ln\left(\frac{c^*}{c_1^*}\right) = \left(\frac{\Delta H_{cris}}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (1.47)$$

Em que R é a constante de gases e c^* é a solubilidade da proteína em solução à temperatura T

1.8 Mecanismo de transporte em proteínas

À medida que o cristal cresce, a concentração de proteína na solução que circunda o cristal diminui, obrigando à difusão de moléculas de proteína do seio da solução até à superfície do cristal para contrariar o gradiente de concentração formado. O soluto adsorvido liberta-se das moléculas de água com as quais estabelece ligações e difunde-se pela superfície e incorpora-se em *kinks*. Ao longo destas etapas, a difusão em solução e a integração no cristal são os passos limitantes para o crescimento do cristal (Lee & Kim, 2003).

Se a velocidade de difusão for diferente da velocidade de incorporação de moléculas no cristal, pode desenvolver-se um gradiente de concentração na vizinhança do cristal. Tendo em conta que a densidade da solução depende da concentração, a solução na vizinhança do cristal com menor densidade (menor concentração) mover-se-á em sentido ascendente formando-se fluxos convectivos em torno do cristal, que promoverão o desaparecimento do gradiente de concentração. No entanto, na interface do cristal forma-se um filme estagnado no qual os fluxos convectivos são muito lentos, e consequentemente, permanece a existência de um gradiente de concentração. Na parte superior do cristal, denominada zona de depleção, por apresentar menor densidade, separa-se do cristal e acompanha o fluxo convectivo. Uma vez que a zona de depleção é muito fina, o cristal em crescimento mantém-se em contato muito próximo com a solução de elevada sobressaturação, e consequentemente a velocidade de crescimento do cristal é elevada.

Se a convecção for suprimida, as moléculas são transportadas até ao cristal por difusão, um processo de transporte de massa muito mais lento que a convecção. Nesta situação formar-se-á uma zona de depleção mais ampla em torno do cristal e o crescimento ocorrerá a uma velocidade menor. Uma vez que as impurezas são muitas vezes maiores que as unidades de crescimento, ir-se-ão difundir mais lentamente, resultando numa menor velocidade de incorporação de impurezas. Assim, os cristais que crescem em condições em que a difusão predomina relativamente à convecção como processo de transporte de massa, apresentarão melhor qualidade (McPherson, 1999; Adawy et al., 2015).

Os efeitos de convecção são minimizados por cristalização em microgravidade, ou por cristalização em soluções com volumes reduzido e de elevada viscosidade garantida por adição de polímeros ou glicerol (Gavira et al., 2014; Lee & Chernov, 2002).

A cessação de crescimento ocorre por diversas razões. A causa mais usual é o decréscimo da concentração de soluto em solução. Os efeitos de deformação da rede cristalina e o envenenamento da superfície cristalina, por incorporação de moléculas de impurezas na face de cristal, podem também causar a interrupção do crescimento do cristal (Lee & Kim, 2003). O investigador Sato e seus colaboradores (1992), recorrendo à técnica de tomografia de dispersão a laser, constataram que a incorporação de moléculas de impurezas ocorre não só na superfície do cristal mas também no interior do mesmo quando este apresenta danificações na rede cristalina (Sato et al., 1992).

2 Métodos de cristalização de proteínas

A escolha do método de cristalização é um dos passos determinantes para garantir bons resultados nos ensaios experimentais.

Difusão de vapor é a técnica mais vulgarmente usada e tem permitido cristalizar mais macromoléculas do que todos os outros métodos combinados (Chayen & Saridakis, 2008; McPherson, 1995). As técnicas *batch* e diálise originam um menor número de cristais, enquanto que a difusão líquido/líquido surge como sendo o método escolhido para cristalização em microgravidade (Koszelak et al., 1995). As dificuldades de manuseamento associadas com a microdiálise conduziram ao aumento da popularidade dos métodos em *batch*, em particular a técnica *microbatch* (Chayen, 2007).

Todos os métodos de cristalização compreendem uma transição de fase em que as moléculas de proteína em solução, num estado de sobressaturação, se associam para formar um núcleo termodinamicamente estável. Uma vez o núcleo formado, a concentração de proteína em solução irá diminuir, conduzindo assim o sistema para a zona metastável onde o crescimento deverá ocorrer sem a formação de mais núcleos (Chayen, 1998).

Na Figura 2.1 estão destacados os quatro principais métodos de cristalização (A: Cristalização *batch*; B: Difusão de vapor; C: Diálise; D: Difusão líquido/líquido) mostrando que, para produzir cristais, todos os sistemas precisam chegar ao mesmo destino, ou seja, à zona de nucleação, podendo depois realizar o seu caminho pela zona metastável e, finalmente atingir a curva de solubilidade.

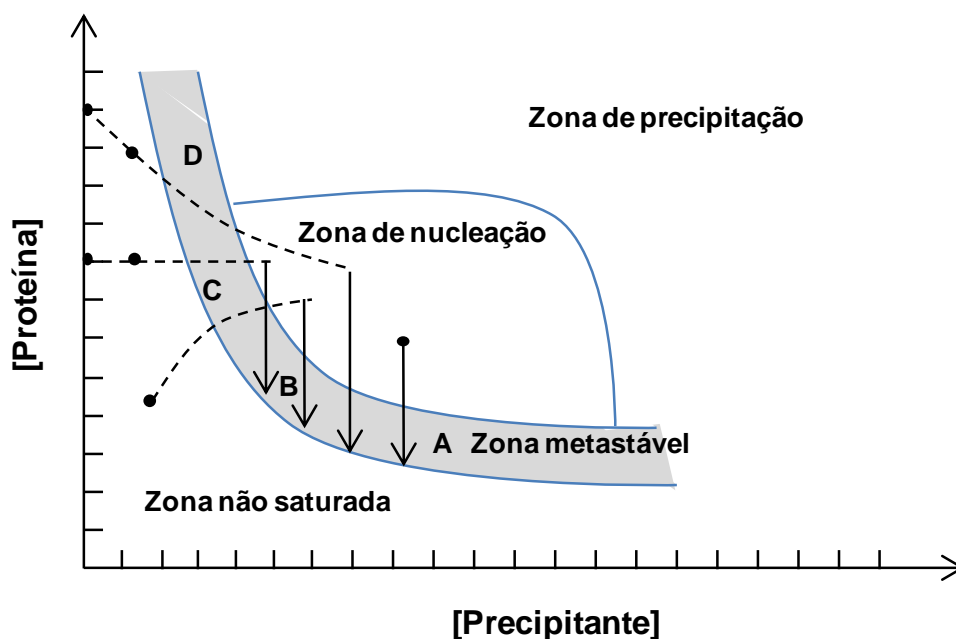


Figura 2.1: Desenho esquemático de um diagrama de fases baseado em dois dos parâmetros mais vulgarmente usados em cristalização de proteínas: as concentrações de proteína e de precipitante (Chayen, 1998).

Os círculos a cheio representam as condições iniciais. No caso da diálise e da difusão líquido/líquido existem dois pontos de partida alternativos uma vez que a solução de proteína não saturada pode conter apenas proteína, ou então, proteína com uma baixa concentração de precipitante.

2.1 Batch

A cristalização em *batch* é uma técnica muito simples. A proteína que se pretende cristalizar e os agentes promotores de cristalização são misturados no início da experiência nas suas concentrações finais. A sobressaturação é atingida após a mistura, e as condições apenas mudam quando as moléculas de proteína se movem da solução para o cristal em crescimento. O diagrama de fases é pouco explorado com esta técnica, e por isso, seria necessário recorrer a muitos ensaios de *batch* para substituir um só ensaio de difusão de vapor.

O método *batch* envolve o uso de grandes quantidades de material, e por isso, não é tão amplamente escolhido. A implementação da técnica *microbatch*, onde as

amostras de cristalização são distribuídas em pequenas gotas cobertas por óleo, superou a necessidade de grandes quantidades de material, reduzindo o consumo de amostra. Além disso, no método *microbatch* as amostras estão protegidas da contaminação do ar dada a menor exposição a que as gotas estão sujeitas.

Na Figura 2.2 está representado um diagrama esquemático das experiências em cristalização *batch* e *microbatch*. Nas experiências em *batch*, os reservatórios contendo soluções de proteína sobressaturada são selados e deixados em repouso. No método *microbatch*, uma pequena gota (2-10 μ l) contendo proteína e precipitante é imersa num óleo inerte que previne a evaporação da gota. Nestes métodos a solução inicial está localizada na zona de nucleação do diagrama de fases (círculo a cheio). Dependendo da concentração da solução após a finalização da cristalização, a concentração da solução de equilíbrio de proteína pode diminuir de tal modo que passe a se situar dentro da região metastável (círculo aberto).

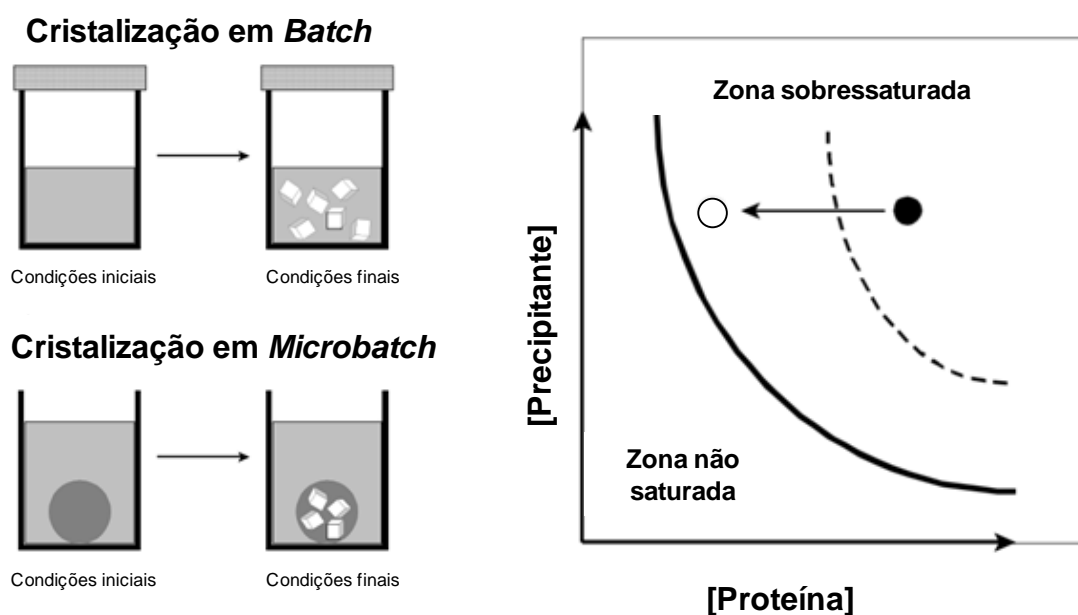


Figura 2.2: Cristalização em *batch* e *microbatch* (Weber, 1997).

Dada a natureza estática da cristalização em *batch*, é necessário garantir que na mistura os níveis de sobressaturação alcançados sejam suficientes para ocorrer a nucleação. Para isso, os componentes da mistura, a concentrações relativamente elevadas, entram em contacto uns com os outros imediatamente após a sua adição. Isto pode causar nucleação brusca levando à formação de inúmeros cristais ou até mesmo a precipitação da proteína.

O facto de a solução permanecer a mesma durante a experiência é ao mesmo tempo uma vantagem e uma desvantagem. Por um lado, sabe-se exatamente as condições em que ocorre a cristalização, contudo, é necessário estar muito perto das condições que promovem o crescimento cristalino para que esta técnica seja bem sucedida. E se for necessário alterar as condições durante a experiência isso implicará uma perturbação na própria gota de cristalização (Weber, 1997).

2.2 Difusão de vapor

Difusão de vapor é o método de cristalização mais usado. Este processo possui duas variantes: *hanging drop* e *sitting drop*. Contrariamente aos métodos em *batch*, a técnica difusão de vapor oferece a possibilidade de manipular as condições dentro de uma solução de proteína por meio da difusão que ocorre a partir da interface líquido/ ar. Os métodos de difusão de vapor consistem numa pequena gota contendo proteína e agentes promotores de cristalização em concentrações abaixo das requeridas para a formação de cristais. Esta gota é equilibrada com um reservatório que gradualmente concentra os componentes presentes na gota de proteína até se atingir o equilíbrio. A diferença na concentração de precipitante entre a gota e a solução do reservatório é a força motriz que provoca a evaporação da água da gota até à concentração de precipitante na gota seja igual à do da solução do reservatório. Durante o processo de difusão (em que tanto os agentes precipitantes como a proteína ficam concentrados), a solução de proteína na gota irá ser conduzida para condições propícias para o evento de cristalização.

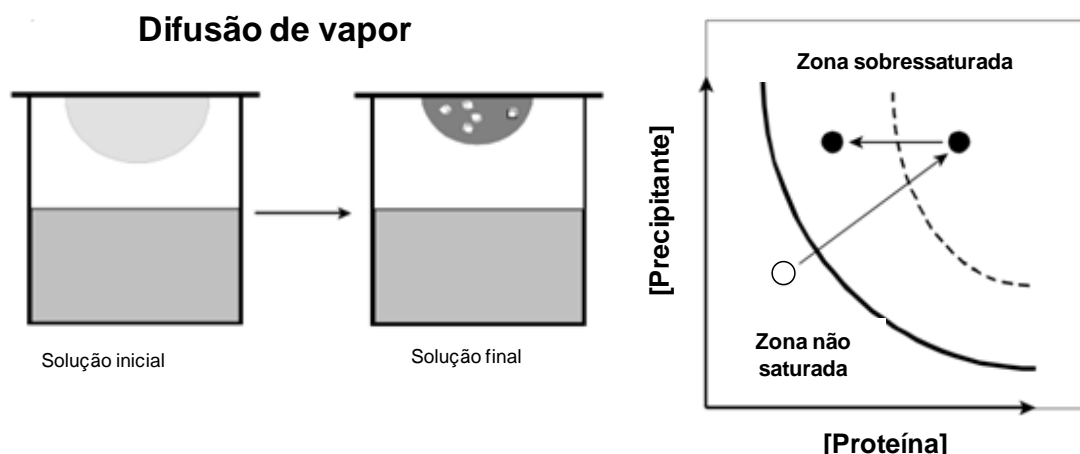


Figura 2.3: Cristalização por difusão de vapor (Weber, 1997).

Na Figura 2.3 está representado o esquema do processo de cristalização por difusão de vapor. Neste método de cristalização, a gota com solução de proteína não saturada contendo precipitante (indicado no diagrama de fases por meio de um círculo branco) está suspensa por cima do reservatório. O equilíbrio-vapor existente entre a gota e o reservatório faz com que a solução de proteína atinja valores de sobressaturação para os quais ocorrem a nucleação e o início do crescimento cristalino (círculo cheio). As alterações da concentração da proteína na gota poderão conduzir à diminuição da sobressaturação ao longo do tempo da experiência (círculo cheio à esquerda).

A principal vantagem da técnica difusão de vapor é a possibilidade de alterar a velocidade de equilíbrio e, assim, aproximando a sobressaturação mais lentamente, através da variação da distância entre o reservatório e a gota. O processo de equilíbrio pode também ser retardado inserindo uma camada de óleo sobre o reservatório. Uma outra vantagem é a capacidade de alterar a composição e/ou a concentração dos componentes na solução durante a experiência sem haver necessidade de tocar na gota. Isto pode ser conseguido por diluição ou concentração do reservatório.

No entanto, o método também tem algumas desvantagens: uma vez atingidas as condições de nucleação, a solução permanece altamente sobressaturada, e por isso, pode ocorrer a nucleação e o rápido crescimento cristalino ao mesmo tempo. Além disso, durante a experiência as condições estão a mudar continuamente, deixando assim como única opção ao investigador adivinhar em que condições exatamente a cristalização ocorre.

As técnicas *batch* e difusão de vapor são as mais amplamente usadas principalmente porque são fáceis de configurar e também é possível automatizar estes métodos. Estudos analíticos sobre o processo de crescimento cristalino são mais fiáveis e reproduzíveis em sistemas em *batch* do que em difusão de vapor. Este facto deve-se a que todos os métodos de cristalização, exceto para o *batch*, envolvem uma mudança nas condições ao longo do processo de cristalização. Em *batch*, o volume e a composição da amostra são conhecidos e permanecem constantes (Chayen, 1998; Weber, 1997).

2.3 Diálise

Assim como nos métodos *batch*, na diálise a concentração de proteína permanece constante durante a cristalização. No entanto, neste método a composição da solução é alterada por meio da difusão de componentes de baixo peso molecular através de uma membrana semipermeável. Deste modo, uma proteína pode ser levada lentamente para o seu ponto de precipitação por diálise contra uma solução concentrada em sal ou em solvente orgânico. A diálise contra água destilada é também um método muito produtivo. A diálise baseia-se na solubilidade limitada de muitas proteínas em força iónica muito baixa, uma vez que as proteínas, para serem solúveis, necessitam de estar rodeadas por uma nuvem de iões de carga positiva e negativa. Contudo, a diálise contra água destilada só é prática quando isso não induz a agregação ou a desnaturação da proteína.

A diálise tem várias vantagens, nomeadamente, a capacidade de mudar a composição da solução de proteína com precisão o número de vezes que se quiser, e o facto de que à medida que a diferença entre a concentração de proteína dentro e fora da membrana diminui, a velocidade de equilíbrio diminui. Além disso, a concentração de proteína permanece constante, de modo que apenas um parâmetro varia de cada vez. Isto permite uma melhor compreensão da função dos diferentes parâmetros.

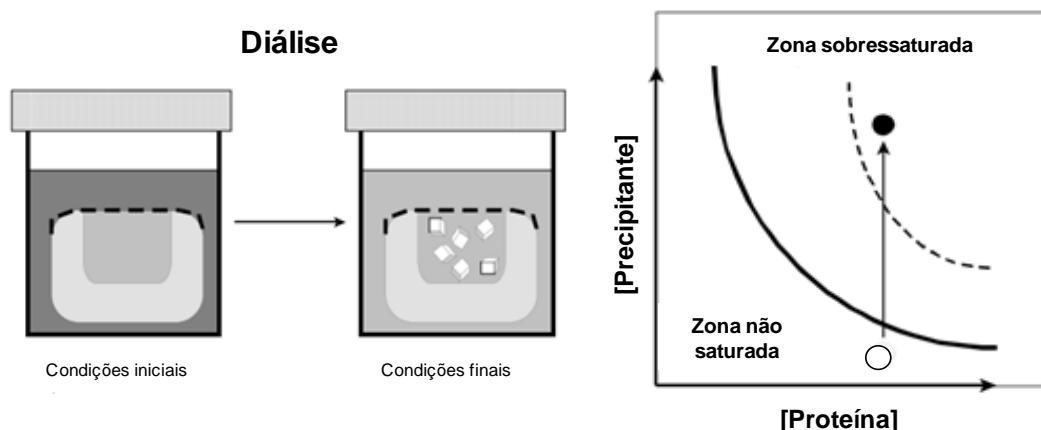


Figura 2.4: Cristalização por diálise (Weber, 1997).

Neste método, a concentração de proteína permanece constante uma vez que as moléculas estão confinadas a um volume fixo. As condições da solução da proteína são alteradas por diálise através de uma membrana semipermeável. Tal como mostra a imagem da esquerda da Figura 2.4, a solução da proteína inicial não está saturada (círculo aberto no diagrama de fases). Mudanças na solução afetam a solubilidade da proteína necessária para atingir níveis de sobressaturação requeridos para a nucleação e o crescimento.

No entanto, por vezes, o que se pretende é que haja uma mudança na concentração da proteína. Nestes casos recorre-se à diálise por concentração. Esta técnica tem como vantagem o facto de que diversas macromoléculas cristalizarão espontaneamente se estiverem suficientemente concentradas a baixa força iónica (Weber, 1997).

2.4 Difusão líquido/líquido

A Figura 2.5 apresenta um diagrama esquemático do processo de difusão líquido/líquido. Quando as soluções de proteína e precipitante entram em contacto na interface, desenvolve-se nessa zona de interação das duas soluções elevada sobressaturação. A solução de proteína está subsaturada (círculo aberto). À medida que a solução de proteína e de precipitante se misturam, a solução torna-se suficientemente sobressaturada para garantir o crescimento cristalino e prevenir a dissolução do cristal (círculo cinzento).

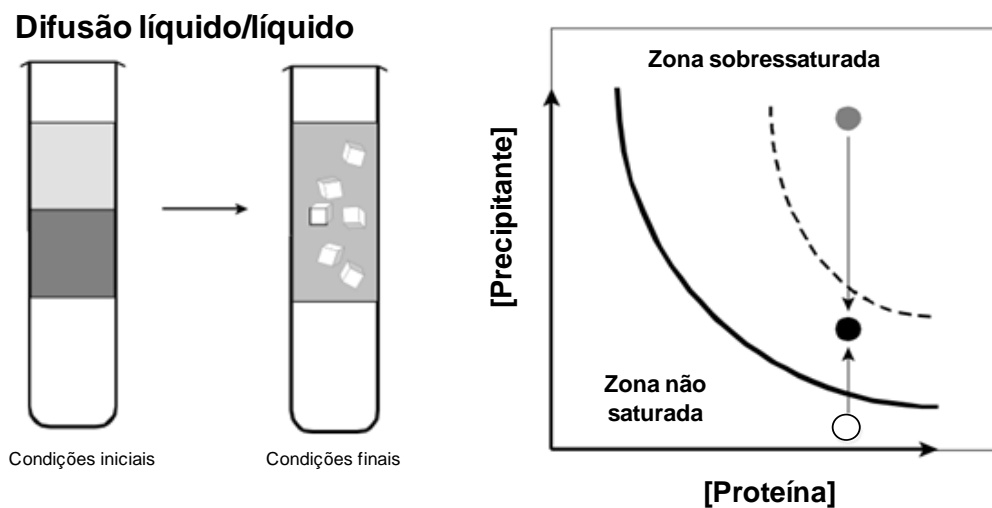


Figura 2.5: Métodos de cristalização que separam condições de nucleação e de crescimento dentro de um único reservatório (Weber, 1997).

A imagem da esquerda da Figura 2.5 mostra que na difusão líquido/líquido os núcleos formam-se na interface entre a solução de proteína concentrada e a solução de precipitante quando estas entram em contacto. Devido à difusão de precipitante na interface, as regiões na vizinhança da solução de proteína ficam sobressaturadas, gerando condições para a ocorrência da cristalização.

À medida que a difusão prossegue, os núcleos mais pequenos dissolvem-se enquanto que os maiores continuam a crescer. Neste método de difusão a proteína precisará de apresentar diferentes solubilidades nos dois solventes e terá de ser possível colocar uma das soluções, em forma de camada, em cima da outra. Um problema que poderá surgir, a menos que a experiência ocorra sobre condições de microgravidade, é os cristais de proteína poderem descer para uma zona com elevada concentração de precipitante. Este acontecimento pode conduzir a um rápido crescimento dos cristais e condicionar a qualidade destes (Weber, 1997).

2.5 Referências bibliográficas

- Adawy, A., Van Der Heijden, E. G. G., Hekelaar, J., Van Enckevort, W. J. P., De Grip, W. J., & Vlieg, E. (2015). A comparative study of impurity effects on protein crystallization: Diffusive versus convective crystal growth. *Crystal Growth and Design*, 15(3), 1150–1159.
- Akella, S. V, Mowitz, A., Heymann, M., & Fraden, S. (2014). Emulsion-Based Technique To Measure Protein Crystal Nucleation Rates of Lysozyme. *Crystal Growth and Design*, 14, 4487–4509.
- Aldabaibeh, N., Jones, M. J., Myerson, A. S., & Ulrich, J. (2009). The solubility of orthorhombic lysozyme crystals obtained at High pH. *Crystal Growth and Design*, 9(7), 3313–3317.
- Becker, R.; Döring, W. (1935). Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigen Dämpfen. *Annalen Der Physik*, 24, 719–752.
- Bernardo, A., Calmanovici, C. E., & Miranda, E. A. (2005). Observance of polymorphic behaviour during dissolution of insulin and lysozyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22(3), 331–339.
- Bolanos-Garcia, V. M., & Chayen, N. E. (2009). New directions in conventional methods of protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101(1–3), 3–12.
- Buckley, H. E. (1952). Crystal growth ideas and crystallographers. *Proceedings of the Physical Society. Section B*, 65, 578–579.
- Bukowska, M. A., & Grütter, M. G. (2013). New concepts and aids to facilitate crystallization. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 409–416.
- Buschmann, S., Richers, S., Ermler, U., & Michel, H. (2014). A decade of crystallization drops: Crystallization of the cbb3 cytochrome c oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *Protein Science*, 23(4), 411–422.

- Cabrera, N., & Vermilyea, D. A. (1958). *In Growth and perfection of crystals*. (R. H. Doremus, B. W. Roberts, & D. Turnbull, Eds.) Wiley. New York.
- Chayen, N. E. (1998). Comparative Studies of Protein Crystallization by Vapour-Diffusion and Microbatch Techniques. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 54, 8–15.
- Chayen, N. E. (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(5), 577–83.
- Chayen, N. E. (2007). *Protein crystallization strategies for structural genomics*. CA, USA: International University Line.
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5, 147–153.
- Chen, D., Sharma, S. K., & Mudhoo, A. (2012). *Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability*. New York: CRC Press.
- Chernov, A. A. (1980). *Modern Crystallography III: Crystal Growth*. Berlin: Springer-Verlag.
- Chernov, A. A. (2004). Notes on interface growth kinetics 50 years after Burton, Cabrera and Frank. *Journal of Crystal Growth*, 264(4), 499–518.
- Crespo, R., Martins, P. M., Gales, L., Rocha, F., & Damas, A. M. (2010). Potential use of ultrasound to promote protein crystallization. *Journal of Applied Crystallography*, 43(6), 1419–1425.
- D’Arcy, A., Bergfors, T., Cowan-Jacob, S. W., & Marsh, M. (2014). Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: What have we learned? *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70, 1117–1126.
- Dale, G. E., Oefner, C., & D’Arcy, A. (2003). The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 88–97. Deller, M. C., Kong, L., & Rupp, B. (2016). Protein stability: a crystallographer’s perspective. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(2), 72–95.

- Derewenda, Z. (2004). Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure*, 12(2), 529–535.
- Dokoumetzidis, A., & Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International Journal of Pharmaceutics*, 321(1–2), 1–11.
- Drenth, J., Dijkstra, K., Haas, C., Leppert, J., & Ohlenschläger, O. (2003). Effect of Molecular Anisotropy on the Nucleation of Lysozyme. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(17), 4203–4207.
- Durbin, S. D., & Feher, G. (1996). *Protein crystallization. Annual review of physical chemistry* (Vol. 47).
- Erdemir, D., Lee, A. Y., & Myerson, A. S. (2008). Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. *Accounts of Chemical Research*, 6(3), 621–629.
- Ferreira, C., Crespo, R., Martins, P. M., Gales, L., Rocha, F., & Damas, A. M. (2011). Small temperature oscillations promote protein crystallization. *CrystEngComm*, 13(8), 3051.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (2000). Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6277–6281.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (2001). Nucleation of protein crystals : critical nuclei , phase behavior , and control pathways. *Journal of Crystal Growth*, 232, 63–76.
- Garcia-Caballero, A., Gavira, J. A., Pineda-Molina, E., Chayen, N. E., Govada, L., Khurshid, S., ... Bill, R. M. (2011). Optimization of protein crystallization: The opticryst project. *Crystal Growth and Design*, 11(6), 2112–2121.
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 22–31.
- Gavira, J. A., Cera-Manjarres, A., Ortiz, K., Mendez, J., Jimenez-Torres, J. A., Patiño-Lopez, L. D., & Torres-Lugo, M. (2014). Use of cross-linked poly(ethylene glycol)-based hydrogels for protein crystallization. *Crystal Growth and Design*,

14(7), 3239–3248.

Gibbs, J. W. (1948). *The Collected Works of J. Willard Gibbs: Thermodynamics*. Yale University Press.

Giegé, R. (2013a). A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS Journal*, 280, 6456–6497.

Giegé, R. (2013b). Crystallogenesis at the heart of the interplay between science and technology in the quest to comprehend tRNA biology. *Crystal Growth and Design*, 13(2), 405–414.

Heijna, M. C. R., Enkevort, W. J. P. Van, & Vlieg, E. (2008). Growth Inhibition of Protein Crystals : A Study of Lysozyme &. *Crystal Growth & Design*, 8(1), 270–274.

Koszelak, S., Day, J., Leja, C., Cudney, R., & McPherson, A. (1995). Protein and virus crystal growth on international microgravity laboratory-2. *Biophysical Journal*, 69, 13–19.

Krestov, G. A. (1991). Thermodynamics of solution: Solution and Dissolution. In *Ions and Solvents; Structure and Energetics*. New York: Ellis Horwood.

Kubota, N. (2001). Effect of Impurities on the Growth Kinetics of Crystals. *Cryst. Res. Technol.*, (36), 749–769.

Kubota, N., & Mullin, J. W. (1995). A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity. *Journal of Crystal Growth*, 152, 203–208.

Kubota, N., Yojota, M., Doki, N., Guzman, L. A., Sasaki, S., & Mullin, W. J. (2003). A Mathematical Model for Crystal Growth Rate Hysteresis Induced by Impurity. *Crystal Growth & Design*, 3(3), 397–402.

Lee, C. P., & Chernov, A. A. (2002). Solutal convection around growing protein crystals and diffusional purification in Space. *Journal of Crystal Growth*, 240(3–4), 531–544.

Lee, E. K., & Kim, W. (2003). Protein Crystallization for Large-Scale Bioseparation. In

- R. H.-K. and B. Mattiasson (Ed.), *Isolation and Purification of Proteins* (Vol. 27, p. 277).
- Lewis, B. (1980). Nucleation and growth theory. In B. R. Pamplin (Ed.), *Crystal Growth* (2nd ed., pp. 23–63). Oxford: Pergamon Press.
- Littlechild, J. A. (1991). Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? *Journal of Physics D: Applied Physics*, 24(2), 111.
- Liu, X. Y. (2000). Heterogeneous nucleation or homogeneous nucleation? *The Journal of Chemical Physics*, 112(22), 9949–9955.
- Lobo, M. S., & Costa, P. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 123–133.
- Luft, J. R., Newman, J., & Snell, E. H. (2014). Crystallization screening: The influence of history on current practice. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(7), 835–853.
- Martin, J., Alcantara, R., & Garcia-Ruiz, J. M. (1991). The Detection of Salting-out. A Comparative Study. *Crystal Research and Technology*, 26(1), 35–42.
- Martins, P. M.; Pesssoa, J.; Sàrkány; Rocha, F.; Damas, A. M. (2008). Rationalizing Protein Crystallization Screenings through Water Equilibration Theory and Protein Solubility Data. *Crystal Growth & Design*, 8(12), 4233–4243.
- Martins, P. M., & Rocha, F. (2007). Characterization of crystal growth using a spiral nucleation model. *Surface Science*, 601(16), 3400–3408.
- Martins, P. M., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2011). Unsteady-state inhibition of crystal growth caused by solution impurities. *CrystEngComm*, 13, 1103–1110.
- Martins, P., Rocha, F. A., & Rein, P. (2006). The influence of impurities on the crystal growth kinetics according to a competitive adsorption model. *Crystal Growth & Design*, 6(12), 2814–2821.
- Mcpherson, A. (1989). *Preparations and Analysis of Protein Crystals*. Malabar, Florida: Krieger.

- McPherson, A. (1995). Increasing the size of microcrystals by fine sampling of pH limits. *Applied Crystallography*, 28, 362–365.
- McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. . Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hardcover.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34, 254–265.
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70(Pt 1), 2–20.
- McPherson, A., & Kuznetsov, Y. G. (2014). Mechanisms, kinetics, impurities and defects: consequences in macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70(Pt 4), 384–403.
- McPherson, A., Kuznetsov, Y. G., Malkin, A., & Plomp, M. (2003). Macromolecular crystal growth as revealed by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 32–46.
- Mullin, J. W. (2001). *Crystallization*. (Butterworth-Heinemann, Ed.) (Fourth Edi). Oxford.
- Myerson, A. S. (2002). *Handbook of industrial crystallization* (second). Butterworth-Heinemann.
- Nagy, Z. K., & Aamir, E. (2012). Systematic design of supersaturation controlled crystallization processes for shaping the crystal size distribution using an analytical estimator. *Chemical Engineering Science*, 84, 656–670.
- Nagy, Z. K., & Braatz, R. D. (2012). Advances and New Directions in Crystallization Control. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng*, 3, 55–75.
- Narayanan, J., & Liu, X. Y. (2003). Protein Interactions in Undersaturated and Supersaturated Solutions: A Study Using Light and X-Ray Scattering. *Biophysical Journal*, 84(1), 523–532.
- Noyes, A. A., & Whitney, W. R. (1897). No Title. *J. Am. Chem. Soc*, 19(930).
- Nývlt, J., Söhnel, O., Matuchová, M., & Broul, M. (1985). *The Kinetics of Industrial*

Crystallization. Prague: Academia.

- Oswald, R., & Ulrich, J. (2015). Dissolution Behavior of Lysozyme Crystals. *Crystal Growth & Design*, 15(9), 4556–4562.
- Plomp, M., McPherson, A., & Malkin, A. J. (2003). Repair of impurity-poisoned protein crystal surfaces. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 50(3), 486–495.
- Rashkovich, L., Gvozdev, N., Sil'nikova, M., Yaminskii, I., & Chernov, A. (2001). Dependence of the step velocity on its length on the (010) face of the orthorhombic lysozyme crystal. *Crystallography Reports*, 46(5), 860–863.
- Rosenbaum, D., Cherezov, V., Hanson, M., Rasmussen, S., Thian, F., Kobilka, T., ... BK, K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, 318(5854), 1266–1273.
- Sahir, K., Saridakis, E., Govada, L., & Chayen, N. E. (2014). Porous nucleating agents for protein crystallization. *Nature Protocols*, 9(7), 1621–1633.
- Saikumar, M. V, Glatz, C. E., & Larson, M. A. (1998). Lysozyme crystal growth and nucleation kinetics. *Journal of Crystal Growth*, 187, 277–288.
- Sangwal, K. (2007). *Additives and crystallization process from fundamentals to applications*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sato, K., Fukuba, Y., Mitsuda, T., Hirai, K., & K., M. (1992). Observation of lattice defects in orthorhombic hen egg white lysozyme crystals with laser scattering tomography. *Journal of Crystal Growth*, 122, 87–94.
- Sazaki, G., Tsukamoto, K., Yai, S., Okada, M., & Nakajima, K. (2005). In situ observation of dislocations in protein crystals during growth by advanced optical microscopy. *Crystal Growth and Design*, 5(5), 1729–1735.
- Shan, G. (2002). Dissolution kinetics of crystals in suspension and its application to L-aspartic acid crystals. *Chemical Engineering Journal*, 88(1–3), 53–58.
- Stewart, P. S., & Mueller-Dieckmann, J. (2014). Automation in biological

crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(6), 686–696.

Strickland-Constable, R. F. (1968). *Kinetics and Mechanism of Crystallization*. London: Academic Press.

Tang, R., Nancollas, G. H., & Orme, C. A. (2001). Mechanism of dissolution of sparingly soluble electrolytes. *Journal of the American Chemical Society*, 123(11), 5437–5443.

Tang, R., Orme, C. A., & Nancollas, G. H. (2004). Dissolution of crystallites: Surface energetic control and size effects. *ChemPhysChem*, 5(5), 688–696.

Teng, H. H. (1998). Thermodynamics of calcite growth: baseline for understanding biomineral formation. *Science*, 282(5389), 724–727.

Tonchev, V. D., & Nanev, C. N. (2013). Growth and dissolution of equally-sized insulin crystals. *Crystal Research and Technology*, 48(11), 1003–1010.

Tsekova, D. S., Williams, D. R., & Heng, J. Y. Y. (2012). Effect of surface chemistry of novel templates on crystallization of proteins. *Chemical Engineering Science*, 77, 201–206.

Van, A. E. S., Gonza, F. M., Dold, P., Tsukamoto, K., & Nakajima, K. (2007). Direct and Noninvasive Observation of Two-Dimensional Nucleation Behavior of Protein Crystals by Advanced Optical Microscopy. *Crystal Growth & Design*, 7(10), 1980–1987.

Vekilov, P. (2005). Two-step mechanism for the nucleation of crystals from solution. *Journal of Crystal Growth*, 275, 65–76.

Vekilov, P. G. (2010). Nucleation. *Crystal Growth & Design*, 10(12), 5007–5019.

Vekilov, P. G. (2016). Nucleation of protein crystals. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62(2), 136–154.

Vekilov, P. G., Feeling-Taylor, A. R., Petsev, D. N., Galkin, O., Nagel, R. L., & Hirsch, R. E. (2002). Intermolecular interactions, nucleation, and thermodynamics of

- crystallization of hemoglobin C. *Biophysical Journal*, 83(2), 1147–56.
- Vekilov, P. G., & Vorontsova, M. A. (2014). Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(3), 271–282.
- Volmer, M. (1939). *Kinetik der Phasenbildung*. (Steinkopff, Ed.). Dresden.
- Vorontsova, M., Maes, D., & Vekilov, P. G. (2015). Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals. *Faraday Discuss.*, 179, 27–40.
- Weber, P. C. (1997). Overview of protein crystallization methods. *Methods in Enzymology*, 276(1988), 13–22.
- Wells, A. F. (1946). Crystal Growth. *Annual Reports on the Progress of Chemistry*, 43, 62–87.
- Yonath, A. (2011). X-ray crystallography at the heart of life science. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), 622–626.
- Yu, X., Ulrich, J., & Wang, J. (2015). Crystallization and stability of different protein crystal modifications: A case study of lysozyme. *Crystal Research and Technology*, 50(2), 179–187.
- Zhu, Y., & Fang, Q. (2013). Analytical detection techniques for droplet microfluidics-A review. *Analytica Chimica Acta*, 787, 24–35.
- Ziabicki, A., & Jarecki, L. (1996). Crystal nucleation in an electric field. *Macromolecular Symposia*, 104, 65–87.

3 Técnicas e instalações experimentais

3.1 Instalações experimentais

As cinéticas de nucleação, crescimento e dissolução de cristais de lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) foram objeto de estudo visando obter um esclarecimento sobre o impacto de alguns parâmetros no processo, em particular, a sobressaturação, impurezas e a composição oligomérica.

Os ensaios experimentais de dissolução, nucleação e crescimento cristalino foram realizados numa instalação experimental constituída essencialmente por uma célula de crescimento encamisada, um estereomicroscópio calibrado *Nikon SMZ1500* equipado com uma camara digital *Nikon DS-R1e* e o programa *Nis-Elements BR 3.1*. Um banho termostaticado, Huber ministat 125-cc-NR foi usado para controlo da temperatura dentro da precisão ± 0.1 °C. As Figura 3.1 e Figura 3.2 apresentam o esquema da unidade experimental. Na Figura 3.3 estão especificadas as dimensões da célula de crescimento.

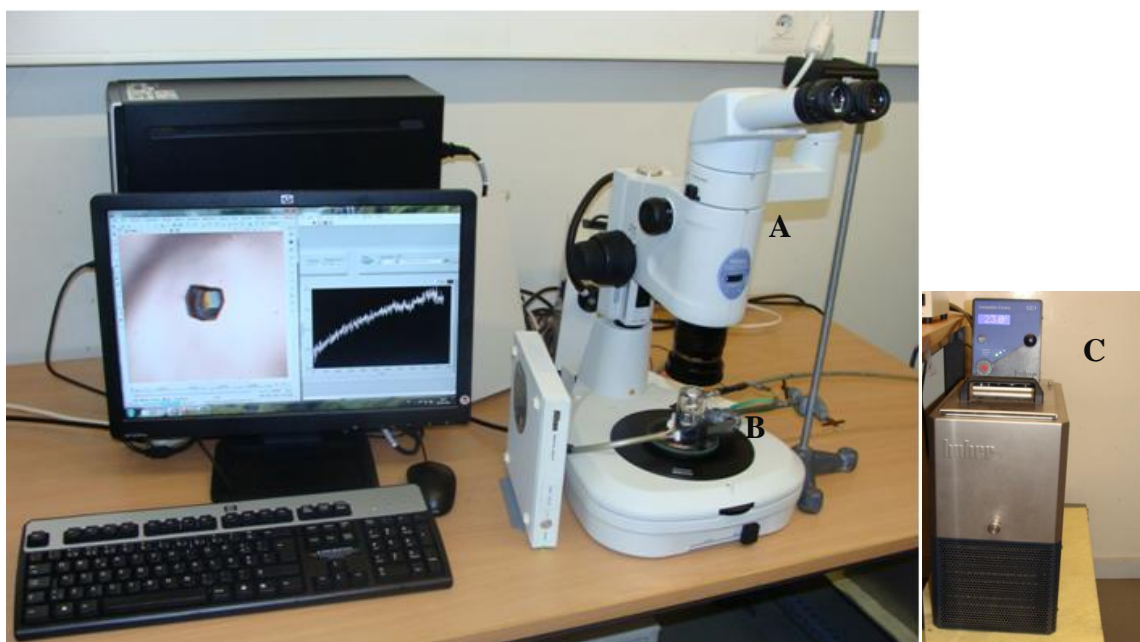


Figura 3.1: Instalação experimental composta por (A) estereomicroscópio calibrado *Nikon SMZ1500* equipado com uma camara digital *Nikon DS-R1e* e o programa *Nis-Elements BR 3.1*, (B) célula de crescimento e (C) banho termostático *Huber ministat 125-cc-NR*.

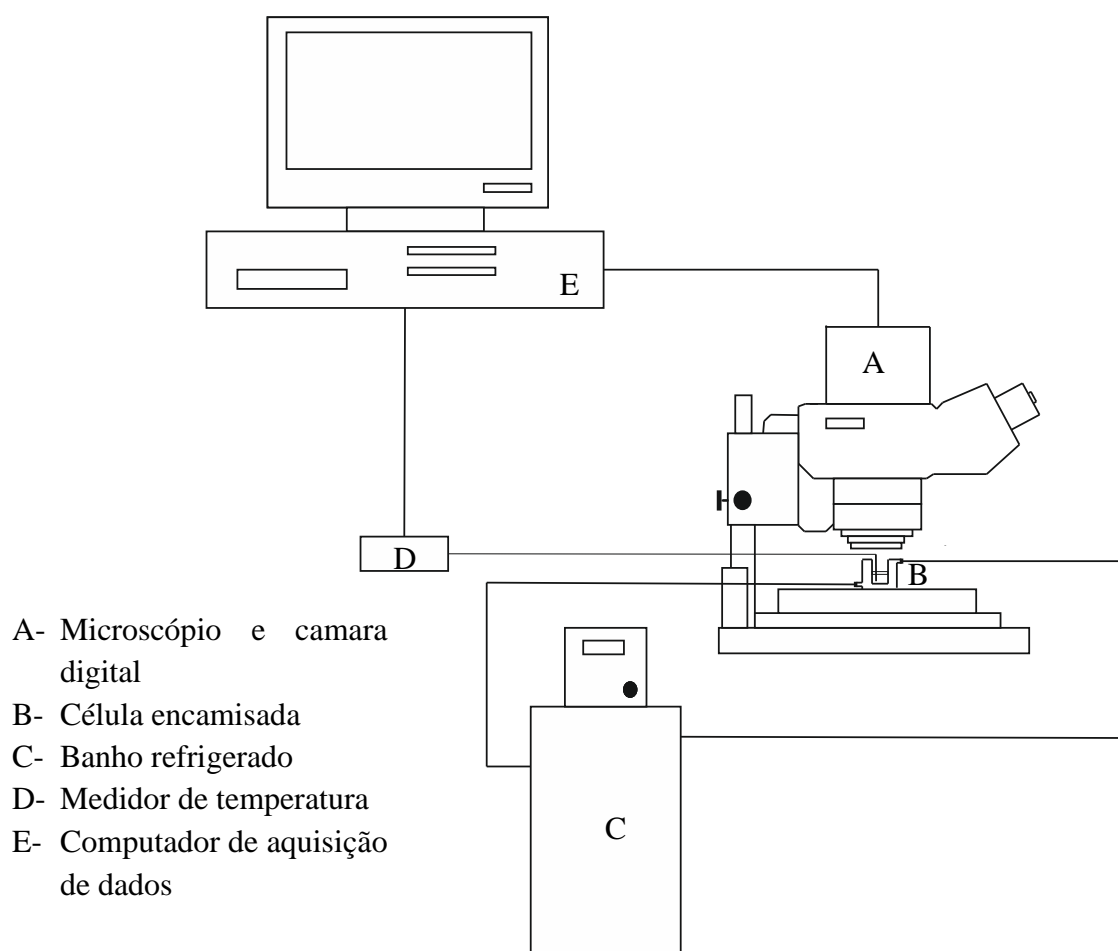


Figura 3.2: Representação esquemática da instalação experimental.

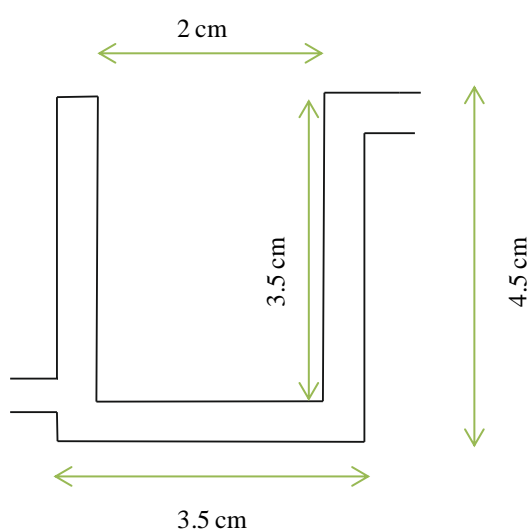


Figura 3.3: Dimensões da célula de crescimento encamisada

3.2 Técnicas experimentais

3.2.1 Produção de cristais pelo método difusão de vapor

Os cristais de HEWL foram produzidos pelo método difusão de vapor, seguindo a técnica *hanging drop*. Conforme evidenciado na Figura 3.4, os ensaios de cristalização foram realizados em placas de 24 poços, usando lamelas siliconizadas de 22 mm de diâmetro (Hampton Research, HR3-231). As gotas de lisozima, introduzidas nas lamelas, foram preparadas adicionando 4.0 μL de 50 mg/mL de solução de lisozima a 4.0 μL de solução de reservatório contendo 3.0, 4.0, 5.0 ou 6.0 % (w/v) de NaCl em 0.2 M de solução tampão de acetato de sódio a pH 4.7. Os poços das placas eram vedados com silicone para evitar a evaporação. Ao fim de alguns dias à temperatura ambiente, as gotas apresentavam cristais que posteriormente eram selecionados e recolhidos para estudos de cinéticas de crescimento.

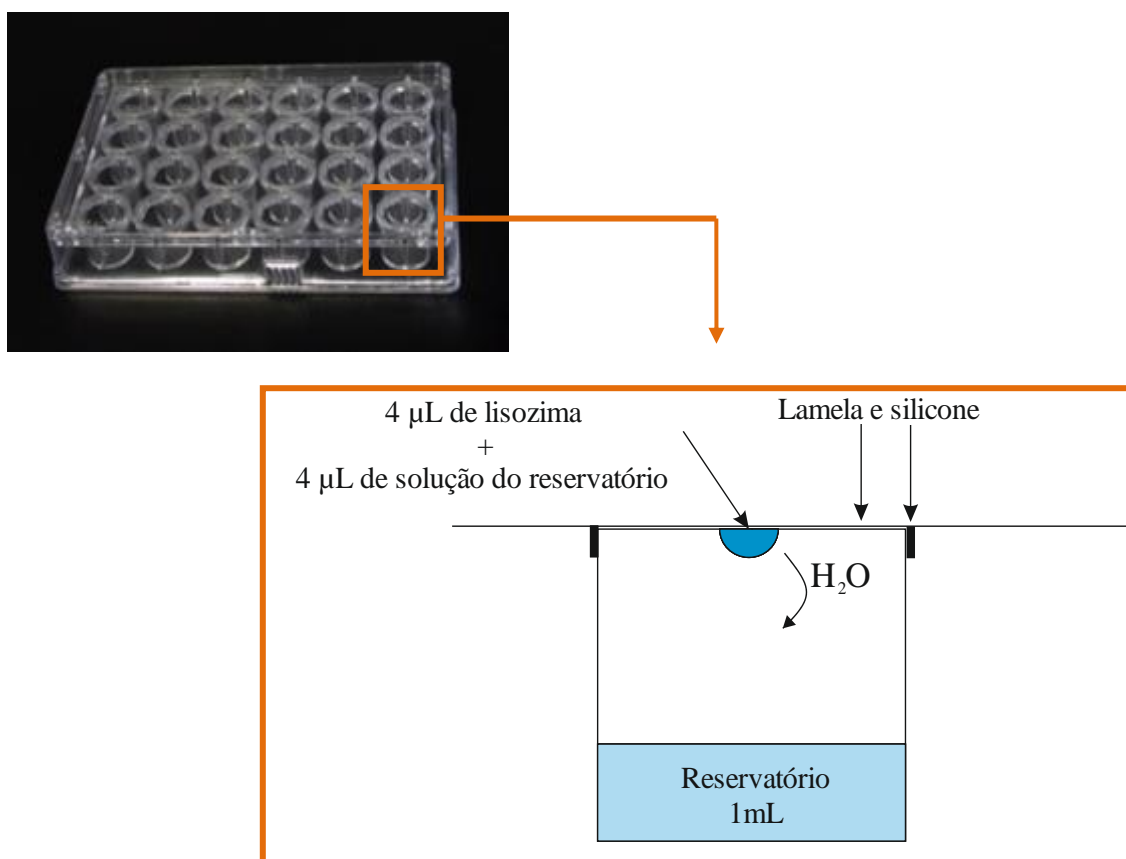


Figura 3.4: Esquema do método de cristalização difusão de vapor recorrendo à técnica de *hanging drop*.

3.2.2 Caraterização de cristais por análise de imagem

A análise de imagem é uma ferramenta prática e versátil que permite não só determinar a morfologia mas também o tamanho das partículas. As partículas são observadas por microscopia ótica, e em seguida, determinam-se parâmetros bidimensionais que caracterizam a forma das partículas (Faria et al., 2003).

Esta técnica tem sido amplamente usada em cristalização para estudar e caraterizar o crescimento de uma população de cristais (Bernard-Michel et al., 1999; Ferreira et al., 2011; Faria et al., 2003; Martins et al., 2005). Neste trabalho, o método de análise de imagem foi implementado para monitorizar o crescimento de cristais individuais de HEWL, para diferentes condições operatórias.

Procedimento experimental

O cristal, introduzido na célula de crescimento, era observado por um estereomicroscópio Nikon SMZ1500 calibrado, equipado com uma camara digital Nikon DS-Ri1 e um programa BR 3.1. A evolução do tamanho e forma do cristal era acompanhada a tempo real, capturando imagens ao longo da experiência. As imagens eram focadas manualmente para ter uma boa definição de linha de contorno do cristal, do ponto de vista do operador. Estas imagens monocromáticas (16-bit) de 1280x1024 pixel RGB eram então analisadas no programa BR 3.1, recorrendo a funções de tratamento de imagem. A preparação automatizada das imagens adotava as seguintes etapas:

- binarização: o número de níveis de cinzento é reduzido de 256 para 2 (imagem binária) por meio de um procedimento automatizado com base na variância do nível de cinzento no histograma (Figura 3.5a-b);
- eliminação de ruído nas imagens por ajustamento dos parâmetros de binarização (Figura 3.5b-c);
- preenchimento das aberturas no interior do perímetro do cristal, aplicando a função *Close on Binary Image* (Figura 3.5c-d);

- aperfeiçoamento dos bordos do cristal, usando a função *Convex Hull* (Figura 3.5d-e);

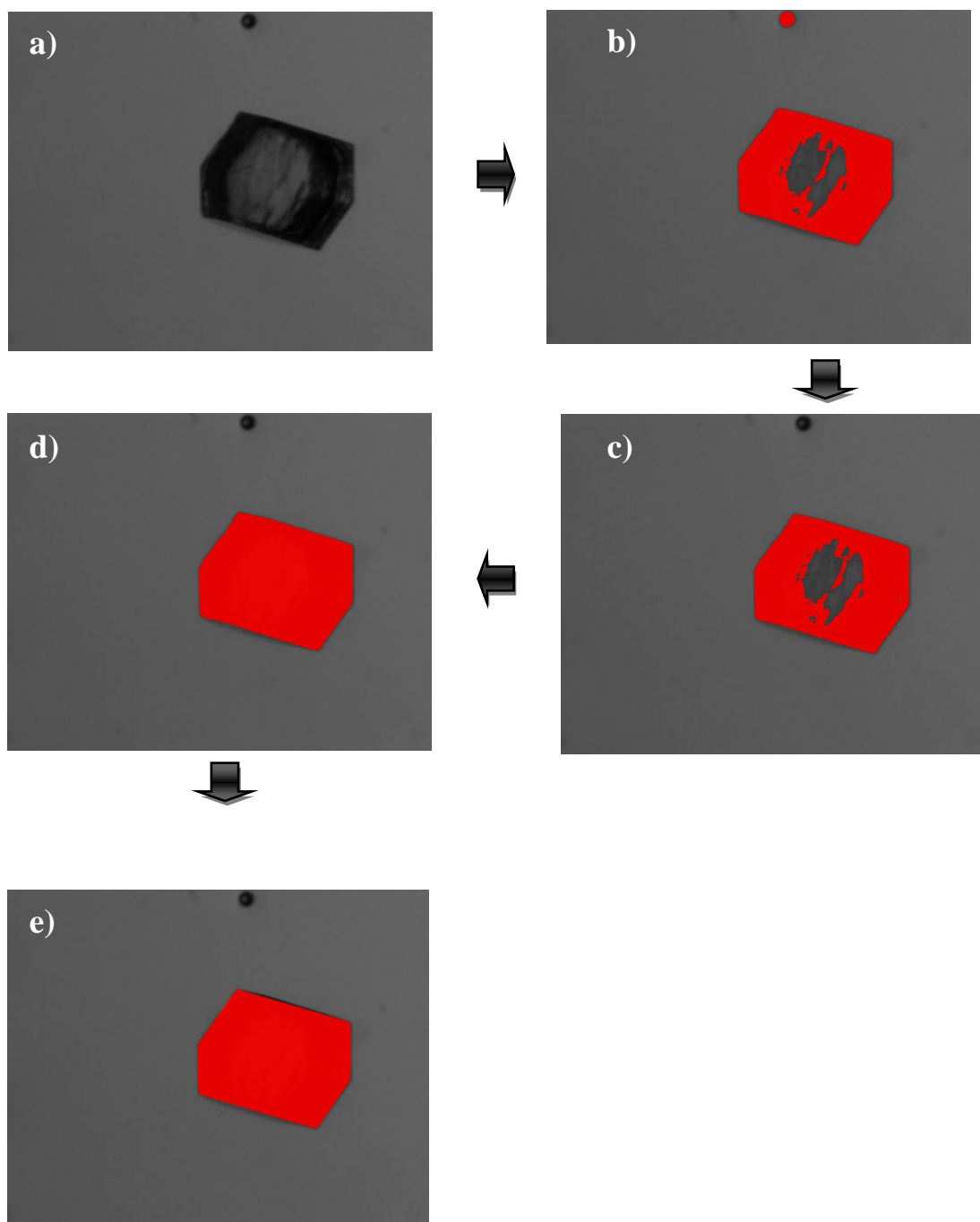


Figura 3.5: Sequência das operações efetuadas às imagens antes das medições dos parâmetros bidimensionais. Esta imagem foi capturada no início de um ensaio de crescimento de um cristal de HEWL.

Uma vez tratada a imagem, alguns parâmetros bidimensionais eram medidos recorrendo ao programa BR. 3.1:

- área projetada, A ;
- diâmetro equivalente – diâmetro do círculo com a mesma área projetada;
- diâmetro de Féret mínimo (F_{\min}): distância mínima entre duas paralelas que tocam o perímetro da partícula;
- diâmetro de Féret máximo: máxima distância entre duas paralelas que tocam o perímetro da partícula.

3.2.3 Caraterização de solução de proteína por DLS

A dispersão dinâmica de luz (DLS), também denominada espectroscopia de fotões, é uma técnica não invasiva de medição de tamanhos e distribuição de tamanhos de moléculas e/ou partículas, situados na gama dos nanómetros e micrómetros. A técnica de DLS pode ser usada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas dispersas ou dissolvidas num solvente líquido. O movimento browniano aleatório das partículas em suspensão permite que a luz laser seja dispersa com intensidades diferentes. As variações de intensidade podem ser avaliadas com base numa função de auto correlação normalizada de segunda ordem:

$$g_2(\tau) = \frac{G_2(\tau)}{\langle I \rangle^2} \quad (3.1)$$

Onde $\langle I \rangle$ é a média de intensidade, τ é o tempo de correlação, e $G_2(\tau)$ é a função de correlação temporal.

Por sua vez, a função de correlação normalizada de segunda ordem está relacionada com a função de correlação de primeira ordem $g_1(\tau)$, que pode ser expressa como:

$$g_1(\tau) = \exp(-q^2 D\tau) \quad (3.2)$$

para partículas sujeitas a difusão *Brownian* em que q é a intensidade do vetor de dispersão e D é o coeficiente de difusão translacional. O vetor de dispersão pode ser expresso como:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.3)$$

onde n é o índice de refração da solução, λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente em vácuo, e θ é o ângulo de dispersão de luz. O raio hidrodinâmico das partículas pode ser calculado a partir do coeficiente de difusão translacional usando a equação *Stokes-Einstein*:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3.4)$$

Onde k_B é a constante de *Boltzmann*; T é a temperatura e η é a viscosidade do solvente (Hoo et al., 2008).

No trabalho de investigação desenvolvido, a técnica de DLS foi usada para caraterizar a composição oligomérica de soluções de HEWL na presença e ausência de precipitante, a diferentes concentrações de HEWL e temperaturas. Este estudo tinha como objetivo proporcionar um melhor entendimento da influência da composição oligomérica no mecanismo de nucleação de HEWL.

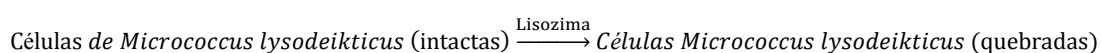
Procedimento experimental

As medições de DLS foram realizadas utilizando um goniómetro ALV / DLS / SLS-5000F, SP-86 (ALV-GmbH, Langen, Alemanha) equipado com um laser *CW diode-pumped Nd:YAG solid-state Compass-DPSS* acoplado com um operador de simetria (Coherent Inc., Santa Clara, CA). O laser operou a 532 nm com uma potência de saída de 400 mW. A escala de intensidade foi calibrada contra tolueno.

Nas cuvetes de vidro de DLS foram introduzidas amostras de 1.0 mL de soluções de HEWL, previamente preparadas. As amostras estiveram em incubação a temperaturas constantes de 16.0 e 25.0 °C e foram periodicamente analisadas com um ângulo de dispersão de 90° com o feixe incidente. Os raios hidrodinâmicos das partículas em solução foram estimados a partir dos coeficientes de difusão obtidos pela análise CONTIN (Provencher, 1982) da Função de Auto-Correlação de intensidade de luz dispersa.

3.2.4 Medição da atividade enzimática de soluções de HEWL

A lisozima integra um grupo de enzimas capazes de quebrar as paredes celulares de determinadas bactérias, em particular as *Micrococcus lysodeikticus*. A velocidade de lise celular está relacionada com a velocidade enzimática da lisozima com base na seguinte reação química (Shugar, 1952):



De modo geral, os ensaios de medição de atividade enzimática envolvem a medição espectrofotométrica de absorvância de um feixe de luz numa suspensão de células bacterianas. À medida que a lisozima vai destruindo as paredes celulares, a quantidade de bactérias em suspensão diminui, e consequentemente, o valor de absorvância medido também diminui de forma gradual (Snyder & Fritsch, 1983).

Neste estudo, a atividade hidrólase glicosídea da HEWL foi medida em gotas de 0.7 µL e 0.4 µL durante os ensaios de crescimento/dissolução para averiguar se a integridade estrutural de HEWL em solução era alterada nos ciclos sucessivos de aumento e diminuição de temperatura.

Procedimento experimental

Durante os ensaios de crescimento/dissolução (ver tópico 4.2), a variação da atividade enzimática de HEWL foi avaliada em gotas de 0.7 μL e 0.4 μL . Em diferentes momentos do ensaio experimental, o volume das gotas em incubação foi aumentado 10x por introdução de solução tampão de acetato de sódio 0.2 M contendo 3% (w/v) de cloreto de sódio. Este procedimento facilitou a recolha de amostra e a consequente diluição em solução tampão de fosfato de potássio 0.07 M, pH 6.24, para obter uma concentração final estimada de 200-400 U/mL. A atividade enzimática foi medida seguindo o protocolo calorimétrico que usa como substrato uma suspensão de células de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizados (Davies et al., 1969). Em particular, 2.50 mL de uma solução de células de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizados a 0.01% (w/v) em 0.07 M de solução tampão de fosfato de potássio, pH 6.24, foi misturada com 0.10 mL de solução tampão de fosfato de potássio numa cuvete de polimetil-metacrilato para realizar o ensaio "branco". A absorvância foi lida a 450 nm num espectrofotómetro UV/Visível com temperatura controlada a 25 °C. De seguida, a mesma quantidade de substrato foi misturada com 0.10 mL de gotas de HEWL diluídas. A diminuição de absorvância foi monitorizada a 25 °C durante 5 min e a atividade enzimática foi calculada a partir do declive da zona linear da curva.

3.3 Referências bibliográficas

- Bernard-Michel, B., Pons, M. ., Vivier, H., & Rohani, S. (1999). The study of calcium oxalate precipitation using image analysis. *Chemical Engineering Journal*, 75(2), 93–103.
- Davies, A., Neuberger, A., & Wilson, B. (1969). The Dependence of Lysozyme Activity on pH and Ionic Strength. *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 294.
- Faria, N., Pons, M. N., Feyer de Azevedo, S., Rocha, F. a., & Vivier, H. (2003). Quantification of the morphology of sucrose crystals by image analysis. *Powder Technology*, 133(1-3), 54–67.
- Ferreira, A., Faria, N., Rocha, F., & Teixeira, J. A. (2011). Using an online image analysis technique to characterize sucrose crystal morphology during a

crystallization run.pdf, 6990–7002.

- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(SUPPL. 1), 89–96.
- Malvern instruments. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. *Department of Biochemistry Biophysics Facility, University of Chambridge*, (1), 207.
- Martins, P. M., Rocha, F. a., & Rein, P. (2005). Modeling sucrose evaporative crystallization. Part 1. Vacuum pan monitoring by mass balance and image analysis methods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(23), 8858–8864.
- Provencher, S. W. (1982). CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 302–309.
- Snyder, J. A., & Fritsch, D. (1983). Two Reliable and Inexpensive Lysozyme Assays for Teaching Enzymology and Microbiology. In *Lysozyme Assays* (pp. 167–179).

Parte I.

Dissolução de Cristais de Lisozima

4 Dissolução

Conteúdo do Capítulo

As soluções de HEWL submetidas a ciclos de arrefecimento/aquecimento para promoção de crescimento/dissolução de cristais, revelaram um comportamento invulgar na fase de dissolução. Os cristais de lisozima dissolviam-se apenas parcialmente em soluções subsaturadas. Além da perda de capacidade de dissolução, o crescimento cristalino era gradualmente mais lento. Análises à atividade enzimática de HEWL comprovaram que estes resultados deviam-se à desnaturação parcial da proteína solúvel em solução causada por fenómenos de interface.

4.1 Introdução

A nucleação, o crescimento cristalino e os diagramas de fases de HEWL têm sido amplamente caracterizados a diferentes temperaturas, pHs e força iónica (Aldabaibeh et al., 2009; Forsythe et al., 1999; Galkin & Vekilov, 2001; Liu et al., 2010). Por outro lado, a dissolução de cristais de proteína é menos estudada na área da cristalografia (Oswald & Ulrich, 2015), apesar das suas aplicações promissoras no controlo de libertação de fármacos (Basu et al., 2004; Oswald & Ulrich, 2015) e na indústria (Ulrich & Pietzsch, 2015).

Em teoria, a dissolução de um cristal é um processo puramente difusivo, dependente da diferença entre o potencial químico da solução e do cristal (Dokoumetzidis & Macheras, 2006; Markov, 2003). Este fato levou-nos a estudar a dissolução de cristais de lisozima como um método de monitorização de variações de atividade termodinâmica causadas, nomeadamente, por *crowders* macromoleculares (Crespo et al., 2016; Crespo et al., 2015; Ellis, 2001).

A lisozima é uma enzima hidrolase glicosídea pelo que a escolha deste sistema permitiu-nos estabelecer uma relação entre a atividade termodinâmica e catalítica. As medições de velocidade de dissolução e atividade enzimática sugerem que a integridade estrutural da proteína é afetada significativamente em condições normais de cristalização, sem recurso a aditivos ou a agentes desnaturantes.

4.2 Método Experimental

Preparação da proteína:

A lisozima liofilizada proveniente da clara de ovo, foi dissolvida em 0.2 M de solução tampão de acetato de sódio, a pH 4.7, contendo 3 % (w/v) de cloreto de sódio. As soluções de 25 mg/mL de lisozima foram preparadas a 37 °C e filtradas em filtros esterilizados com 0.22 µm de abertura de poro (*Millipore Millex-GV*)

Ensaio de crescimento/ dissolução de cristais:

O crescimento e a dissolução de cristais de HEWL foram observados usando um estereomicroscópio calibrado *Nikon SMZ 1500* equipado com uma camera *digital Nikon DS-Ri1* e um programa *Nis-Elements BR 3.1* (ver tópico Instalações experimentais). Numa célula de crescimento termostatzada foram introduzidas pequenas gotas de solução de HEWL preparadas previamente, e cobertas com 1 mL de óleo de parafina para evitar a evaporação (ver Figura 4.1).

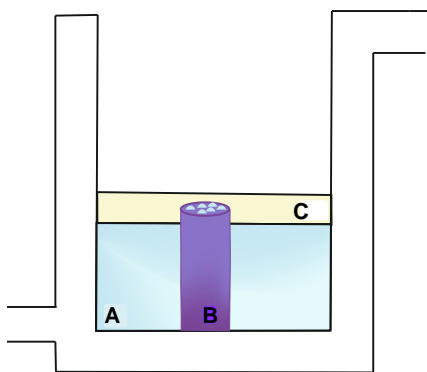


Figura 4.1: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de crescimento/dissolução constituída por: A) 2 mL de água, B) gotas de solução de HEWL colocadas num cilindro de vidro (*glass sitting drop rods*) e C) 1 mL de óleo de parafina.

A temperatura do sistema foi arrefecida a velocidade constante de 37 °C para 10 °C ao longo de 81 min, e em seguida foi mantida constante a 10 °C durante 180 min para promover a formação e crescimento de cristais de HEWL. Para completar o ciclo de cristalização/dissolução, a temperatura foi elevada de 10 °C para 37 °C ao longo de 81 min e mantida a 37 °C durante mais 900 min. O sistema esteve sujeito a 6 ciclos de temperatura sucessivos. A área projetada de cristais de HEWL selecionados foi periodicamente medida e convertida para diâmetro equivalente de um círculo (\bar{L}).

As velocidades instantâneas de crescimento (R_G) e de dissolução (R_D) do cristal foram determinadas calculando o declive da zona linear da curva \bar{L} em função do tempo. Ao fim de alguns ciclos, os cristais não se dissolveram ao fim do período estipulado para a dissolução (900 min).

4.3 Resultados obtidos

O fenómeno de paragem de dissolução do cristal foi observado, pela primeira vez, numa gota de volume muito reduzido, um salpico proveniente da pipetagem de uma gota de 0.7 μL . Para estudar este fenómeno de forma sistemática, gotas com diferentes volumes foram submetidas a ciclos de temperatura sucessivos, descritos na secção experimental e representados na Figura 4.2A. Adotou-se um período longo de dissolução para garantir que a dissolução parcial não era determinada por cinéticas lentas. No caso apresentado, o aparecimento de cristais de HEWL foi monitorizado numa gota de 0.7 μL e em duas gotas de 0.4 μL antes do período de dissolução. Os cristais selecionados estão identificados por círculos a cores diferentes e as setas indicam o instante de captação de imagens. Após um número variado de ciclos, os cristais de HEWL paravam de dissolver, tendo o volume de gota um contributo notório nesta ocorrência. No exemplo apresentado na Figura 4.2A, os cristais dissolveram-se totalmente nos primeiros 3 ciclos, em gotas de 0.7 μL . Por outro lado, no caso da gota achatada de 0.4 μL , a paragem de dissolução ocorre durante o segundo ciclo de temperatura. E na gota arredondada de 0.4 μL , a cessação da dissolução foi observada durante o terceiro ciclo.

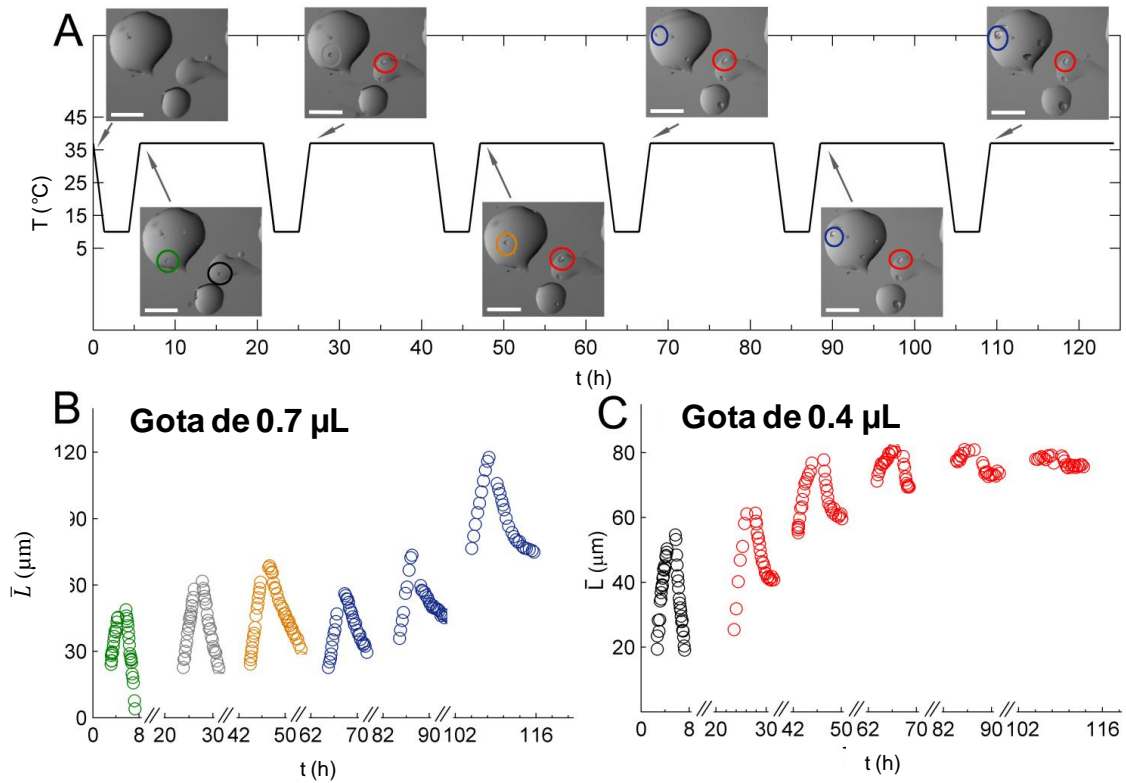


Figura 4.2: (A) Programa de temperatura imposto para promover a cristalização (a 10 °C) e a dissolução dos cristais (a 37 °C). As barras brancas representam 1.0 mm de escala. O diâmetro equivalente \bar{L} dos cristais selecionados foi seguido ao longo do tempo (B e C). Cores diferentes representam cristais diferentes.

Apesar de ocorrer dispersão de comportamentos de gota para gota, e de cristal para cristal na mesma gota, foram identificados um conjunto de traços característicos na evolução de tamanho de cristais durante os períodos de crescimento e dissolução. Exemplificando algumas dessas características, as Figura 4.2B e Figura 4.2C mostram que a variação do diâmetro equivalente \bar{L} com o tempo é aproximadamente linear durante os primeiros ciclos de temperatura. Após um número variável de ciclos, são obtidos perfis curvilíneos de \bar{L} versus tempo, indicando que os processos de transição de fase (crescimento e dissolução) são gradualmente mais lentos. Por vezes, esta tendência culmina com a cessação completa de dissolução e de crescimento dos cristais. Tal como apresentado na Figura 4.2B, dissoluções progressivamente mais lentas não são necessariamente acompanhadas por velocidades de crescimentos mais lentas, mesmo quando o processo de dissolução está praticamente parado. Assim, comparativamente à

dissolução, o abrandamento do crescimento cristalino só é notório em ciclos de temperatura posteriores. No caso limite apresentado na Figura 4.2C, o tamanho do cristal não variou significativamente ao longo do 6º ciclo de crescimento/dissolução, o que indica que variações de temperatura de 37 °C para 10 °C e vice-versa não têm aparentemente qualquer efeito no equilíbrio cristal-solução. A representação dos resultados na Figura 4.2B e Figura 4.2C em termos de velocidade de crescimento e dissolução (Figura 4.3) permite extrair duas observações importantes: primeiro, as velocidades de dissolução diminuem rapidamente de ciclo para ciclo, especialmente nas gotas mais pequenas; segundo, as velocidades de crescimento também diminuem mas não de forma tão drástica e em ciclos de temperatura posteriores.

As Figura 4.3A e Figura 4.3B incluem exemplos de paragem de dissolução numa das etapas a 37 °C, seguido por restabelecimento da velocidade de dissolução no início da etapa subsequente a 37 °C (após um período intermédio de crescimento a 10 °C). Por outro lado, as velocidades de crescimento cristalino permanecem aproximadamente constantes (Figura 4.3A) ou diminuem gradualmente (Figura 4.3B) nos sucessivos ciclos de temperatura. Em consequência, a terceira observação extraída é que durante ciclos consecutivos o cristal poderá recuperar a capacidade de dissolução mas não a de crescimento.

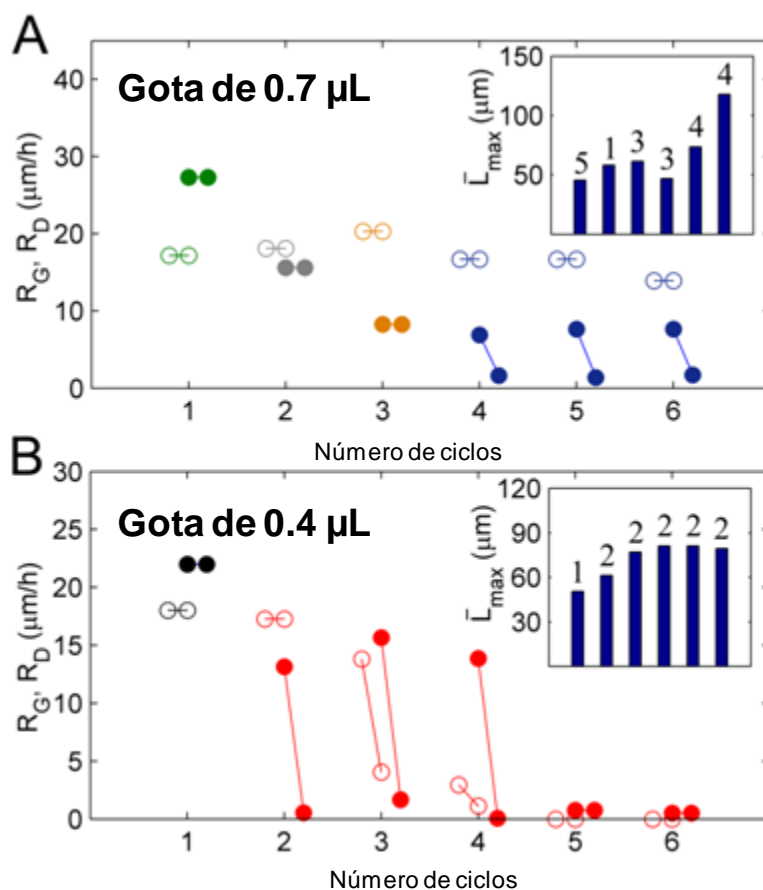


Figura 4.3: Variação de R_G (símbolos abertos) e R_D (símbolos a cheio) de cristais (identificados a cores diferentes) ao longo de um período de 3 horas em cada ciclo de temperatura.

As inserções nas Figura 4.3A e Figura 4.3B apresentam o diâmetro equivalente \bar{L} dos cristais selecionados no final do período de cristalização e os valores no topo das barras verticais indicam o número de cristais presentes na gota selecionada. Estas inserções mostram que o tamanho de cristais no final da fase de cristalização aumentou nitidamente após a observação de paragem de dissolução, e o número de cristais nas gotas não variou significativamente. Como resultado, a concentração de HEWL solúvel em solução diminuiu ao longo do ensaio à medida que cristais de maiores dimensões eram obtidos (quarta observação).

Para averiguar se a integridade estrutural de HEWL em solução é afetada nas gotas de cristalização, a atividade da hidrolase glicosídea da HEWL foi medida periodicamente durante a incubação de gotas de 0.7 e 0.4 µL. Todas as amostras foram recolhidas a 37 °C e a atividade enzimática foi medida usando como substrato células de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizadas. Na Figura 4.4 estão apresentados os valores

médios e desvios padrões dos replicados das medições de atividade enzimática normalizada ao valor médio inicial (A/A_0). A Figura 4.4 mostra que a atividade catalítica decresce significativamente ao longo do tempo, o que indica que uma fração apreciável de moléculas de HEWL sofreu alterações na sua estrutura nativa (quinta observação). O efeito do volume da gota na velocidade de desativação não é claro dado o grau de incerteza dos resultados. As inserções da Figura 4.4 dizem respeito aos valores médios e desvios padrões de replicados de medições de absorvância (a 280 nm) em gotas de 0.7 μL (azul) e 0.4 μL (vermelho), normalizadas ao valor médio inicial ($\text{Abs}_{280}/\text{Abs}_0$). Os valores de absorvância medidos são praticamente constantes, indicando que a perda de atividade enzimática da HEWL não é acompanhada por uma variação significativa da concentração molar.

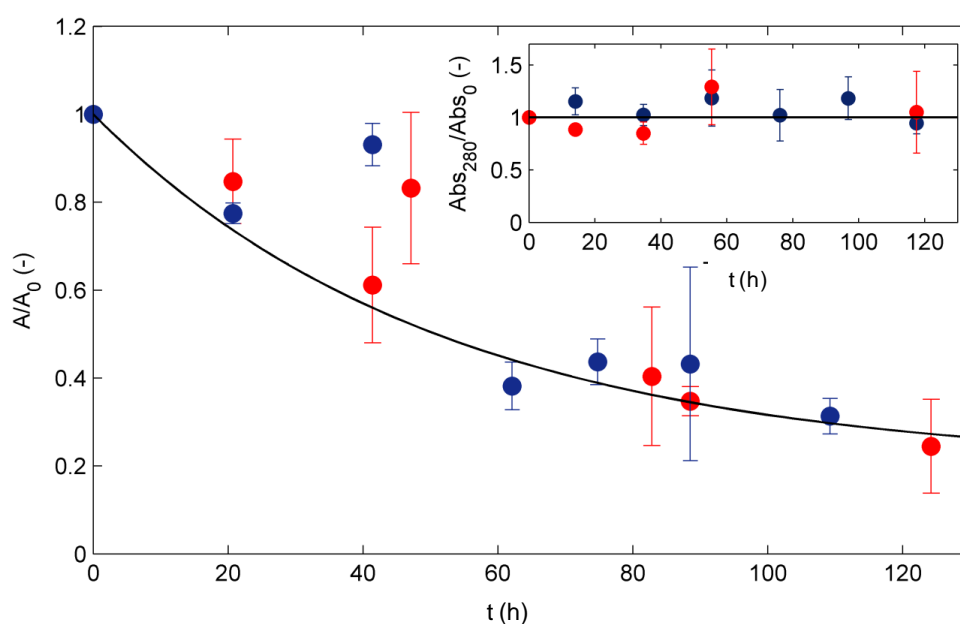


Figura 4.4: A perda de atividade enzimática de HEWL em gotas de 0.7 μL (azul) e 0.4 μL (vermelho) submetidas a condições experimentais e ao programa de temperatura descrito na Figura 4.2A.

4.4 Discussão

Os ciclos de temperatura sucessivos nos ensaios em *microbatch* provocaram um aumento global do tamanho de cristais (quarta observação), e a consequente diminuição de HEWL em solução. Por sua vez, este evento pode explicar a diminuição de velocidade de crescimento cristalino (segunda observação) como uma consequência de valores mais baixos de sobressaturação, definida aproximadamente como $\sigma = (c - c^*)/c^*$ sendo c a concentração de proteína em solução e c^* a solubilidade de proteína.

De forma análoga, se se admitir que os cristais que não se dissolveram estão num estado de pseudo-equilíbrio, as velocidades de dissolução inconstantes (terceira observação) podem ser justificadas com base na concentração de HEWL solúvel durante o período intermédio de crescimento a 10 °C. Quando a temperatura retorna a 37 °C, a solução de proteína fica subsaturada ($c^* > c$) e a dissolução é restabelecida. Contudo, a questão primordial e de maior interesse permanece sem resposta: por que razão os cristais de HEWL param de dissolver durante a suposta etapa de dissolução? Este fenómeno tem similaridades com a cessação de crescimento cristalino, observada pela primeira vez na cristalização de lisozima (Durbin & Feher, 1986), em resultado do envenenamento da superfície cristalina por impurezas (Durbin & Feher, 1986; Ferreira et al., 2013; Martins et al., 2011; Sánchez-Pastor et al., 2006). Mas, sendo a dissolução cristalina um processo puramente difusivo é pouco credível que possa ser inativada por baixas concentrações de impurezas que não exerceram qualquer efeito no crescimento cristalino.

Também foi tido em conta o papel de perfis de concentração não homogêneos em gotas caracterizadas por valores elevados da razão área superficial/volume. Nestas circunstâncias pode ocorrer a adsorção de uma quantidade significativa de proteína solúvel ao longo das interfaces, de tal modo que a concentração no meio é significativamente diminuída (Alahverdijeva et al., 2008; Martins & Rocha, 2008; Miller et al., 2004). Ainda, em ensaios de difusão de vapor, a evaporação da gota conduz ao aumento de concentração de proteína nas interfaces, pelo que os níveis elevados de sobressaturação tendem a originar novos eventos de nucleação (García-Ruiz et al., 2016). No entanto, as diferenças entre as condições do meio e da interface não fornecem uma resposta satisfatória para a observação de cristais fixos pararem de

dissolver ou crescer quando sujeitos a temperaturas entre 37 e 10 °C. Assim, entende-se que variações de concentração locais podem justificar os comportamentos inesperados na dissolução ou no crescimento mas não a ocorrência dos dois em simultâneo.

Este comportamento pode estar relacionado com a adsorção interfacial de HEWL enquanto catalisadora de alterações conformacionais (Kubiak-Ossowska & Mulheran, 2010) que poderão culminar na desnaturação da proteína (Alahverdijeva et al., 2008). Como já referido, as gotas mais pequenas apresentam valores elevados de área interfacial por unidade de volume. Assim, estas gotas apresentam frações mais elevadas de macromoléculas adsorvidas cujos rearranjos estruturais podem comprometer, por vezes irreversivelmente, a função biológica nativa.

A perda de atividade catalítica da HEWL solúvel pode explicar o comportamento de dissolução observado desde que se admita que também ocorre um aumento da atividade termodinâmica. Devido à desnaturação parcial de moléculas de HEWL, um número apreciável de aminoácidos, até aí ocultos na cadeia polipeptídica, ficam expostos ao solvente, diminuindo assim a disponibilidade de moléculas de água no equilíbrio de solvatação (Figura 4.5). Este fenómeno, designado *solvation-out*, foi identificado anteriormente na agregação de proteínas em fibras de amiloide (Crespo et al., 2016; Crespo et al., 2012). Nestas condições, as moléculas de proteína que se libertam da estrutura cristalina durante a dissolução estão rodeadas por um menor número de moléculas de água do que o esperado. Isto conduz (i) ao aumento de concentração efetiva de proteína, (ii) à diminuição em módulo da variação de entalpia de solução (Collins, 2004) e (iii) ao abrandamento do processo de dissolução até por fim cessar.

A cadeia de acontecimentos que conduz ao efeito de *solvation-out* e à interrupção de dissolução é ligeiramente diferente para o crescimento cristalino. Neste caso, apenas moléculas de proteína que conservam a sua função biológica nativa, integrarão a estrutura cristalina. Assim, durante a cristalização, o aumento da atividade termodinâmica (causado pela desnaturação) e a diminuição de moléculas de água disponíveis, são contrabalançados pela diminuição de concentração de moléculas de proteína ativa em solução. Devido à redução do número de macromoléculas cristalizáveis em solução, a força diretriz que governa o crescimento cristalino é

globalmente menos afetada pelos rearranjos conformacionais do que a força diretriz para a dissolução.

Em conclusão, a paragem de dissolução seguida de paragem de crescimento cristalino é explicada com base na variação na atividade termodinâmica de HEWL solúvel após a desnaturação. Os cristais que não se dissolvem são o resultado de uma desnaturação parcial de proteína solúvel, levando ao aumento da atividade termodinâmica global de HEWL por efeito de *solvation-out*. A cessação de crescimento só ocorre em ciclos de temperatura subsequentes, após a diminuição da concentração de HEWL ativa em solução provocados pelo crescimento cristalino e pela desnaturação da proteína.

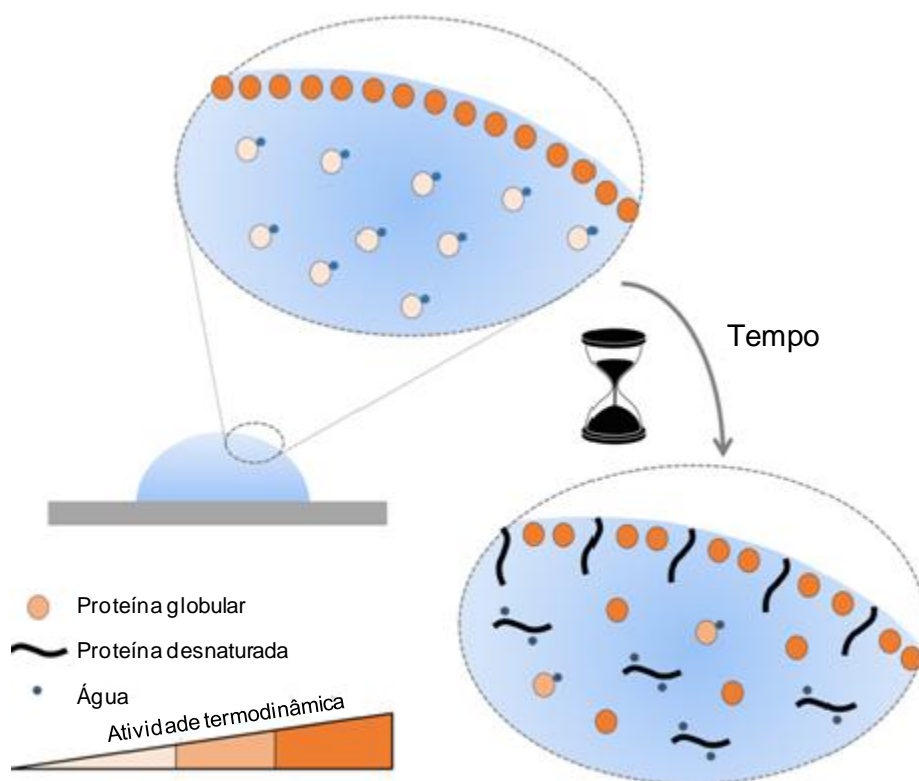


Figura 4.5: Esquema detalhado do mecanismo de adsorção interfacial de moléculas de proteína na interface líquido/ óleo que promove a desnaturação progressiva de proteínas globulares, e por sua vez, a redução de moléculas de água disponíveis.

A Figura 4.6 apresenta uma prova de conceito numérica, na qual as Figura 4.6A e Figura 4.6B representam as premissas do problema enquanto que as Figura 4.6C e Figura 4.6D sugerem uma possível solução. Tendo como base as medições de tamanho do cristal ao longo do tempo (Figura 4.2), o número de cristais (Figura 4.3) e a atividade enzimática (Figura 4.4), são representados na Figura 4.6A valores característicos da concentração de HEWL e da sua fração ativa ao longo do tempo, bem como os valores de solubilidade de HEWL durante os períodos de crescimento (c_{10}^*) e dissolução (c_{37}^*) (linhas a tracejado). As inserções da Figura 4.6A mostram a curva exponencial de fração de moléculas de HEWL ativa (x_a) em função do tempo (t), expressa da seguinte forma: $x_a = 0.6 + 0.4e^{-6.61 \times 10^{-3}t}$. A Figura 4.6B apresenta os valores de velocidades de crescimento cristalino (R_G) e dissolução (R_D), calculados assumindo proporcionalidade direta entre R_G e $(c - c_{10}^*)$ e entre R_D e $(c_{37}^* - c)$. Na Figura 4.6C, os perfis de concentração (Figura 4.6A) são convertidos em perfis de atividade termodinâmica da HEWL ativa (a_a) e da HEWL total (a_T). As linhas a tracejado correspondem aos valores de atividade termodinâmica de HEWL em equilíbrio a 10 °C (a_{10}^*) e a 37 °C (a_{37}^*). Na Figura 4.6D, os valores de velocidade de transição de fase foram calculados considerando proporcionalidade direta entre R_G e $(a_a - a_{10}^*)$ e entre R_D e $(a_T^* - a_{37})$.

No exemplo considerado, a paragem de dissolução ocorre pela primeira vez no terceiro ciclo, altura em que a concentração inicial de proteína (25 mg/mL) deixa de ser restabelecida após dissolução.

Durante o quarto ciclo, a dissolução a 37 °C é retomada apenas parcialmente, uma vez que o aumento de concentração não é suficiente para compensar a queda de concentração resultante da fase anterior de crescimento. Durante o quinto e sexto ciclos, a concentração de HEWL não aumenta uma vez que não ocorre dissolução do cristal. Ao adotar um valor de solubilidade coincidente com o valor final de concentração de proteína do sexto ciclo de crescimento ($c_{10}^* = 22.8$ mg/mL), reproduz-se a situação anteriormente representada nas Figura 4.2C e Figura 4.3B, na qual a paragem de crescimento foi observada no fim do último ciclo.

A evolução das velocidades de dissolução estimadas (Figura 4.6B) evidencia que não é possível explicar a interrupção de dissolução de cristais apenas recorrendo a previsões do perfil de concentração de proteína. Pois, supostamente, a perda gradual de

proteína em solução deveria acelerar o processo de dissolução, e não retardá-lo. Por isso, a simulação da paragem de dissolução obriga a considerações adicionais.

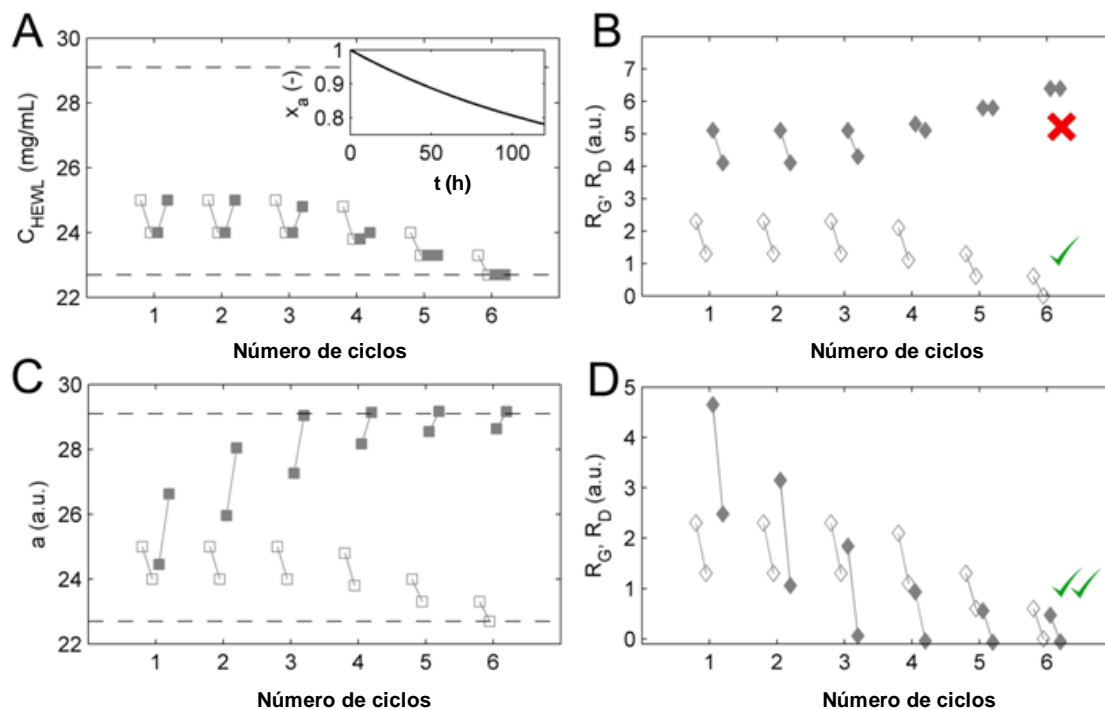


Figura 4.6: (A) Perfis de concentração de HEWL durante os períodos de crescimento (símbolos abertos) e de dissolução (símbolos cheios). (B) Velocidades de crescimento cristalino (R_G , símbolos abertos) e dissolução (R_D , símbolos a cheio) determinadas com (C) perfis de atividade termodinâmica da HEWL ativa e da HEWL total, em unidades arbitrárias; (D) Valor de R_G e R_D no início e fim de cada ciclo calculados com base no perfil de atividade termodinâmica.

Como já referido, o cálculo das forças diretrizes para cristalização e dissolução com base nas atividades termodinâmicas proporciona um entendimento claro e elucidativo para o caso de interrupção simultânea das transições de fase (Figura 4.6C e Figura 4.6D). O processo de dissolução é determinado pela atividade termodinâmica da proteína solúvel (a_T), por sua vez, a cristalização é determinada pela atividade termodinâmica de moléculas de proteína que mantêm a sua estrutura original (a_a). A inativação de proteínas e o efeito *solvation-out* contribuem para o aumento de a_T e para a diminuição de a_a . Assim, no exemplo da Figura 4.6C, considera-se que a_T aumenta linearmente com a fração de moléculas desnaturadas ($1 - x_a$), de acordo com a

expressão: $a_T = c(1 + 1.2(1 - x_a))$. O efeito de inativação de proteínas é contrabalançado no valor de a_T pela diminuição da concentração de HEWL ativa, enquanto que a_a é assumido permanecer numericamente igual à concentração de HEWL. A seleção de coeficientes de atividade foi baseada nos resultados experimentais obtidos de diminuição de concentração e de perda de atividade catalítica (Figura 4.6A) e nos perfis de velocidades de crescimento e dissolução (Figura 4.3). Uma vez que a fase de equilíbrio é definida em relação a condições padrão, as alterações na conformação de proteína não têm qualquer impacto na solubilidade termodinâmica, considerada numericamente igual aos valores de concentração adotados na Figura 4.6A: $a_{10}^* = c_{10}^*$ e $a_{37}^* = c_{37}^*$.

O novo cenário evidenciado na Figura 4.6D confirma que a paragem de dissolução ocorre tendencialmente mais cedo que a cessação de crescimento, mesmo quando a concentração de proteína diminui de ciclo para ciclo. Os efeitos de inativação de proteína e *solvation-out* explicam não só as primeiras e segundas observações (aparentemente paradoxais) como também são consistentes com a observação de ressurgimento de dissolução após a sua paragem (terceiro resultado). Em concordância com os dados experimentais, as variações nos valores de R_D entre ciclos são mais acentuadas do que as observadas nos valores de R_G , que tendem a decrescer até à cessação total (Figura 4.6D).

A hipótese termodinâmica explicativa de fenómenos de estagnação de dissolução tem implicações adicionais, além da sua contribuição no estudo fundamental dos processos de dissolução e de crescimento. Os protocolos de cristalização biomoleculares podem ser otimizados de modo a diminuir a instabilidade estrutural provocada por fenómenos de interface. A adsorção de proteína nas interfaces líquido/ar, líquido/óleo ou líquido/sólido não só diminui a concentração efetiva do meio, como também conduz a rearranjos conformacionais que reduzem o número de macromoléculas cristalizáveis em solução. Esta ocorrência não terá impacto significativo em proteínas fáceis de cristalizar, para as quais o efeito de *solvation-out* ou a existência de regiões não homogêneas podem até promover novos eventos de nucleação. Mas no caso de proteínas difíceis de cristalizar, que frequentemente requerem a estabilização química da estrutura molecular, qualquer fonte de instabilidade adicional pode comprometer o processo de transição de fase (Bukowska & Grütter, 2013; Derewenda, 2004; Rosenbaum et al., 2007). A etapa de adsorção interfacial que

antecede a modificações conformacionais pode ser monitorizada usando métodos biofísicos em alternativa aos métodos bioquímicos mais drásticos. Neste respeito, os marcadores fluorescentes na presença de desnaturação térmica do polipéptido podem ser usados para medir o ponto médio de desnaturação (T_m) e avaliar as condições mais apropriadas de solução tampão, pH, força iónica e aditivos que estabilizam a estrutura molecular (Ericsson et al., 2006; Reinhard et al., 2013; Ristic et al., 2015). Precipitantes tais como 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) que se ligam a resíduos hidrofóbicos devem ser escolhidos para promover a hidratação e estabilização de proteína (Anand et al., 2002). Além das suas propriedades crioprotetoras e de redução de solubilidade (*salting out*), a eficácia de MPD, polietilenoglicol (PEG) (Radaev & Sun, 2002; Vera & Stura, 2014) e glicerol (Vera et al., 2011) como agentes de cristalização não podem ser dissociados dos seus efeitos protetores contra modificações nas ligações não covalentes nas moléculas de proteína. O mesmo princípio é aplicável à exploração de líquidos iónicos estabilizadores proteicos (Pusey et al., 2007) e de hidrogéis poliméricos capazes de criar convecção natural e promover condições favoráveis de cristalização de proteínas (Gavira & Driessche, 2013; Lorber et al., 2009; Gavira et al., 2014).

Esta nova abordagem, sustentada nos resultados obtidos, não só contempla alguns casos de sucesso na cristalização macromolecular, como também destaca a estabilidade da amostra como um fator-chave para explicar, por exemplo, a razão de cristais de maiores dimensões se desenvolverem nas primeiras horas do ensaio (McPherson & Cudney, 2014) ou o motivo de grande parte das estruturas armazenadas em *Structural Genomics Consortium, Oxford*, terem sido determinadas recorrendo a cristais produzidos nos primeiros dias de incubação (Ng et al., 2016). A tendência para uso de gotas com volume cada vez menor deve ser encarado com prudência, pois conforme verificado, valores elevados de área superficial por unidade de volume podem acelerar adsorção de proteína e a sua desnaturação. A miniaturização da amostra pode ser harmonizada com o controlo do fenómeno interfacial por reavaliação do tipo de materiais de construção, tratamento de superfície e de óleos de isolamento adotados nos métodos de difusão de vapor, difusão líquido-líquido e *microbatch*. Este trabalho mostrou que a adsorção e desnaturação de moléculas de proteína na interface sólido-líquido é uma variável importante a introduzir no debate sobre os materiais mais adequados para construção de dispositivos de microfluidos para cristalização de proteínas (Dhouib et al., 2009).

4.5 Conclusões

A paragem de dissolução dos cristais de HEWL está relacionada com o aumento da atividade termodinâmica de proteína solúvel, resultante de fenómenos interfaciais e *unfolding* gradual das moléculas de proteína. Devido aos valores da área superficial por unidade de volume mais elevados, as gotas mais pequenas potenciam a adsorção interfacial de moléculas de proteína, e a consequente desnaturação das mesmas. Uma vez desnaturadas, o rearranjo da cadeia polipeptídica permite que um maior número de aminoácidos sejam expostos ao solvente, o que deverá contribuir para a diminuição do número de moléculas de água disponíveis para participar no processo de dissolução – efeito de *solvation-out*.

A instabilidade conformacional é expressa na perda de atividade enzimática de HEWL ao longo do tempo. A concentração efetiva de macromoléculas cristalizáveis é favorecida pelo efeito de *solvation-out* e afetada negativamente pela inativação da proteína. As proteínas difíceis de cristalizar são mais sensíveis ao efeito de desnaturação, o que justifica otimizações nos protocolos de cristalização visando o controlo dos fenómenos interfaciais em especial quando são usados volumes miniaturizados. Para tal, devem-se selecionar as condições da solução (solução tampão, pH, força iónica, aditivos e hidrogéis) e interfaces (líquido/ar, líquido/óleo e líquido/líquido) que minimizam os efeitos interfaciais na estrutura conformacional de proteína.

4.6 Referências bibliográficas

- Alahverdjieva, V. S., Grigoriev, D. O., Ferri, J. K., Fainerman, V. B., Aksenenko, E. V., Leser, M. E., ... Miller, R. (2008). Adsorption behaviour of hen egg-white lysozyme at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 323(1–3), 167–174.
- Aldabaibeh, N., Jones, M. J., Myerson, A. S., & Ulrich, J. (2009). The solubility of

orthorhombic lysozyme crystals obtained at High pH. *Crystal Growth and Design*, 9(7), 3313–3317.

Anand, K., Pal, D., & Hilgenfeld, R. (2002). An overview on 2-methyl-2, 4-pentanediol in crystallization and in crystals of biological macromolecules An overview on 2-methyl-2, 4-pentanediol in macromolecules. *Acta Crystallographica D*, D58, 1722–1728.

Basu, S. K., Govardhana, C. P., Junga, C. W., & Margolina, A. L. (2004). Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(3), 301–317.

Bukowska, M. A., & Grütter, M. G. (2013). New concepts and aids to facilitate crystallization. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 409–416.

Collins, K. D. (2004). Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 34(3), 300–311.

Crespo, R., Rocha, F. a, Damas, A. M., & Martins, P. M. (2012). A generic crystallization-like model that describes the kinetics of amyloid fibril formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30585–30594.

Crespo, R., Villar-Alvarez, E., Taboada, P., Rocha, F. A., Damas, A. M., & Martins, P. M. (2016). The availability of soluble amyloidogenic protein is decreased in the presence of insoluble off-pathway aggregates.

Crespo, R., Villar-Alvarez, E., Taboada, P., Rocha, F., Damas, A., & Martins, P. (2015). What Can the Kinetics of Amyloid Fibril Formation Tell about Off-pathway Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 2018–2032.

Derewenda, Z. (2004). Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure*, 12(2), 529–535.

Dhouib, K., Khan Malek, C., Pfleging, W., Gauthier-Manuel, B., Duffait, R., Thuillier, G., ... Sauter, C. (2009). Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. *Lab Chip*, 9(10), 1412–1421.

- Dokoumetzidis, A., & Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International Journal of Pharmaceutics*, 321(1–2), 1–11.
- Durbin, S. D., & Feher, G. (1986). Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 76(3), 583–592.
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding : obvious but under appreciated. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26(10), 597–604.
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N., & Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, 357(2), 289–298.
- Ferreira, C., Rocha, F. A., Damas, A. M., & Martins, P. M. (2013). On growth rate hysteresis and catastrophic crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, 368, 47–55.
- Forsythe, E. L., Judge, R. a., & Pusey, M. L. (1999). Tetragonal Chicken Egg White Lysozyme Solubility in Sodium Chloride Solutions. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(3), 637–640.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (2001). Nucleation of protein crystals : critical nuclei , phase behavior , and control pathways. *Journal of Crystal Growth*, 232, 63–76.
- García-Ruiz, J. M., Otálora, F., & García-Caballero, A. (2016). The role of mass transport in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(2), 96–104.
- Gavira, J. A., Cera-Manjarres, A., Ortiz, K., Mendez, J., Jimenez-Torres, J. A., Patiño-Lopez, L. D., & Torres-Lugo, M. (2014). Use of cross-linked poly(ethylene glycol)-based hydrogels for protein crystallization. *Crystal Growth and Design*, 14(7), 3239–3248.
- Gavira, J. A., & Driessche, A. E. S. Van. (2013). Growth of Ultrastable Protein – Silica Composite Crystals. *Crystal Growth & Design*, 13, 2522–2529.
- Kubiak-Ossowska, K., & Mulheran, P. A. (2010). Mechanism of hen egg white lysozyme adsorption on a charged solid surface. *Langmuir*, 26(20), 15954–15965.

- Liu, Y., Wang, X., & Ching, C. B. (2010). Toward Further Understanding of Lysozyme Crystallization: Phase Diagram, Protein–Protein Interaction, Nucleation Kinetics, and Growth Kinetics. *Crystal Growth & Design*, 10(2), 548–558.
- Lorber, B., Sauter, C., Théobald-Dietrich, A., Moreno, A., Schellenberger, P., Robert, M. C., ... Giegé, R. (2009). Crystal growth of proteins, nucleic acids, and viruses in gels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101(1–3), 13–25.
- Markov, I. V. (2003). *Crystal Growth for Beginners: Fundamentals of Nucleation, Crystal Growth, and Epitaxy* (2nd ed.). World Scientific.
- Martins, P. M., & Rocha, F. a. (2008). Kinetic studies on the influence of temperature and growth rate history on crystal growth. *Crystal Research and Technology*, 43(12), 1258–1267.
- Martins, P. M., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2011). Unsteady-state inhibition of crystal growth caused by solution impurities. *CrystEngComm*, 13, 1103–1110.
- McPherson, A., & Cudney, B. (2014). Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70, 1445–1467.
- Miller, R., Fainerman, V. B., Leser, M. E., & Michel, M. (2004). Surface tension of mixed non-ionic surfactant/protein solutions: comparison of a simple theoretical model with experiments. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 233(1–3), 39–42.
- Ng, J. T., Dekker, C., Reardon, P., & von Delft, F. (2016). Lessons from ten years of crystallization experiments at the SGC. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 72(2), 224–235.
- Oswald, R., & Ulrich, J. (2015). Dissolution Behavior of Lysozyme Crystals. *Crystal Growth & Design*, 15(9), 4556–4562.
- Pusey, M. L., Paley, M. S., Turner, M. B., & Rogers, R. D. (2007). Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids. *Crystal Growth & Design*, 7(4), 787–793.

- Radaev, S., & Sun, P. D. (2002). research papers Crystallization of protein \pm protein complexes research papers. *Applied Crystallography*, 35(i), 674–676.
- Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., & Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(2), 209–214.
- Ristic, M., Rosa, N., Seabrook, S. A., & Newman, J. (2015). Formulation screening by differential scanning fluorimetry: How often does it work? *Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications*, 71, 1359–1364.
- Rosenbaum, D., Cherezov, V., Hanson, M., Rasmussen, S., Thian, F., Kobilka, T., ... BK, K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, 318(5854), 1266–1273.
- Sánchez-Pastor, N., Pina, C. M., Fernández-Díaz, L., & Astilleros, J. M. (2006). The effect of on the growth of barite {001} and {210} surfaces: An AFM study. *Surface Science*, 600(6), 1369–1381.
- Ulrich, J., & Pietzsch, M. (2015). What is a protein crystal? Can we apply the terminology of classical industrial crystallization to them? *Crystal Research and Technology*, 50(7), 560–565.
- Vera, L., Czarny, B., Georgiadis, D., Dive, V., & Stura, E. a. (2011). Practical Use of Glycerol in Protein Crystallization. *Crystal Growth & Design*, 11(7), 2755–2762.
- Vera, L., & Stura, E. A. (2014). Strategies for protein cryocrystallography. *Crystal Growth and Design*, 14(2), 427–435.

Parte II.

Crescimento cristalino

5 Efeito das impurezas na cinética de crescimento em estado não estacionário

Conteúdo do Capítulo

O efeito das impurezas no mecanismo de crescimento cristalino foi investigado em soluções de HEWL impuras em estado não estacionário. Para tal, realizaram-se experiências de crescimento cristalino com diferentes perfis aquecimento/arrefecimento e arrefecimento/aquecimento de modo a analisar a influência de diferentes velocidades de aumento/diminuição de sobressaturação no crescimento do cristal na presença de impurezas. Os resultados obtidos mostraram que o crescimento de cristais de lisozima pode ser acelerado, retardado ou até suprimido, variando a velocidade de variação da sobressaturação.

5.1 Introdução

Os efeitos indesejáveis das impurezas nas soluções são um aspeto crítico durante a produção de materiais cristalinos em processos industriais (Vekilov, 2007; Villeneuve et al., 2005; Ward, 2005), bem como, na produção de cristais de elevada qualidade para a determinação de estruturas 3D em cristalografia raios-X (Chayen & Saridakis, 2008; McPherson, 2004) e para aplicações óticas e eletrónicas (Stamplecoskie et al., 2008; Thomas et al., 2004; Zaitseva & Carman, 2001; Zaitseva et al., 2011). Por outro lado, a presença de aditivos solúveis pode afetar marcadamente a mineralização fisiológica (Davis et al., 2000; Meldrum & Cölfen, 2008; Meldrum & Sear, 2008; Rimer et al., 2010; Yoreo & Dove, 2004). O nível de sobressaturação σ , a força motriz termodinâmica para a cristalização, é um parâmetro crucial no crescimento cristalino na presença de impurezas (Davis et al., 2000). Neste capítulo descobriu-se que a velocidade de variação da sobressaturação R_σ pode alterar de modo significativo o comportamento do crescimento cristalino relativamente às condições de estado

estacionário. Esta variável, ainda não explorada, pode ser usada para promover ou inibir o crescimento de cristais de materiais orgânicos e inorgânicos.

De modo geral, curvas de crescimento expressando a influência do nível de sobressaturação na velocidade de crescimento cristalino (G) são um meio de avaliação da atividade de uma dada impureza/aditivo. O modelo de adsorção competitiva (CAM), abordado no tópico 1.4.1.2, tem permitido a descrição de diversos tipos de curvas de crescimento com perfis incomuns (Martins et al., 2006). Nomeadamente, as curvas de crescimento tipo-2, caracterizadas pela inexistência de um limite mínimo de sobressaturação abaixo do qual cessa o crescimento (Martins et al., 2006), e as curvas de crescimento com forma de U invertido, resultantes da adsorção de impurezas na superfície do cristal em estado não (Martins et al., 2009; Martins et al., 2011). O modelo CAM assume que as impurezas são submetidas a dois passos de adsorção consecutivos, em primeiro lugar na superfície cristalina, e depois nos locais ativos para crescimento (ou *kinks*). A fração de locais ativos ocupados por impurezas (θ_l) é diretamente proporcional à superfície coberta (θ_s), sendo a constante de proporcionalidade representada por β (θ_l/θ_s). O parâmetro β é comparável ao fator de eficácia de impurezas previsto pelo mecanismo *pinning* (Cabrera & Vermilyea, 1958; Kubota & Mullin, 1995; Pina, 2011). O abaixamento das velocidades de crescimento é dado por:

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \beta\theta_s \quad (5.1)$$

Onde G e G_0 correspondem a velocidades de crescimento cristalino na presença e ausência de impurezas, respetivamente.

O objetivo deste trabalho foi investigar o significado da constante de proporcionalidade β , de modo a proporcionar um melhor entendimento de comportamentos ainda pouco explorados, como sejam as cinéticas de crescimento com aceleração não linear (Georgiou & Vekilov, 2006; Land et al., 1999; Rashkovich & Kronskey, 1997) e os fenómenos de histerese durante o crescimento cristalino.

Por definição, o valor de θ_l aumenta com o tempo, à medida que o número de *kinks* ocupados por impurezas (n_i) aumenta, e/ou o número total de *kinks* (n_T) diminui:

$$\frac{d\theta_l}{dt} = \frac{d(n_i/n_T)}{dt} = \frac{1}{n_T} \frac{dn_i}{dt} - \theta_l \frac{d \ln n_T}{dt} \quad (5.2)$$

Considerando a definição de β , a equação anterior pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{d\beta}{dt} + \beta \frac{d \ln \theta_s}{dt} = \frac{1}{\theta_s n_T} \frac{dn_i}{dt} - \beta \frac{d \ln n_T}{dt} \quad (5.3)$$

A variação de n_i resulta de uma diferença entre velocidades instantâneas de adsorção (constante cinética k_i) e dessorção (constante cinética k_{-i}):

$$\frac{dn_i}{dt} = k_i n_T \theta_s - k_{-i} n_i \quad (5.4)$$

As equações 5.2 e 5.4 fornecem uma primeira definição de β , em condições de estado estacionário:

$$\beta_e = \frac{\theta_l}{\theta_s} \Big|_e = \frac{k_i}{k_{-i}} \quad (5.5)$$

Onde o subscrito e diz respeito à condição de equilíbrio. Combinando as duas equações anteriores, obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{1}{\theta_s n_T} \frac{dn_i}{dt} = k_{-i} (\beta_e - \beta) \quad (5.6)$$

Assumindo que σ aumenta/diminui linearmente com o tempo, a uma velocidade constante de $R_\sigma = d\sigma/dt$, a combinação das equações 5.3 e 5.6 conduz a:

$$\frac{R_\sigma}{k_{-i}} \frac{d\beta}{d\sigma} = \beta_e - \beta \left(1 + \frac{R_\sigma}{k_{-i}} \phi \right) \quad (5.7)$$

onde ϕ é o resultado da influência de σ em n_T e em θ_s :

$$\phi = \frac{d \ln n_T}{d\sigma} + \frac{d \ln \theta_s}{d\sigma} \quad (5.8)$$

Este parâmetro assume valores positivos quando a influência positiva de σ na formação de novos locais ativos é mais forte que a influência negativa na adsorção de impurezas na superfície.

A Figura 5.1 apresenta uma sequência de imagens que representam as densidades de sítios ativos livres (círculos verdes) e de impurezas adsorvidas (círculos vermelhos) à medida que σ aumenta. Na Figura 5.1A, os círculos vermelhos estão predominantemente localizados nas arestas das camadas em crescimento para simbolizar a elevada atividade das impurezas. A imagem no topo representa a superfície de um cristal em crescimento a sobressaturações constantes: σ_1 , σ_2 e σ_3 . A imagem a meio apresenta o efeito de envenenamento resultante do atraso na dessorção de impurezas nos sítios ativos. A imagem de baixo demonstra o efeito de purificação causado por um atraso da adsorção de impurezas nos sítios ativos recém-formados. Na Figura 5.1B estão representadas curvas de crescimento cristalino na ausência (linha a tracejado) e na presença (linhas sólidas) de impurezas. As linhas sólidas correspondem às três sequências de imagens representadas na Figura 5.1A.

A equação 5.7 prevê que a variação de σ pode contribuir para um efeito de envenenamento, caracterizado por valores de β superiores a β_e , ou um efeito de purificação, quando $\beta < \beta_e$. O efeito de envenenamento (Figura 5.1A, sequência intermédia no esquema) resulta do atraso na dessorção das impurezas em *kinks* ($R_\sigma \phi < 0$, na equação 5.7). Por outro lado, o efeito de purificação (Figura 5.1A, sequência em baixo no esquema) é manifestado quando ocorre um atraso na adsorção de impurezas em *kinks* ($R_\sigma \phi > 0$). Em ambos os casos, o restabelecimento do equilíbrio de adsorção pode ser impedido caso ocorra uma variação de σ suficientemente rápida.

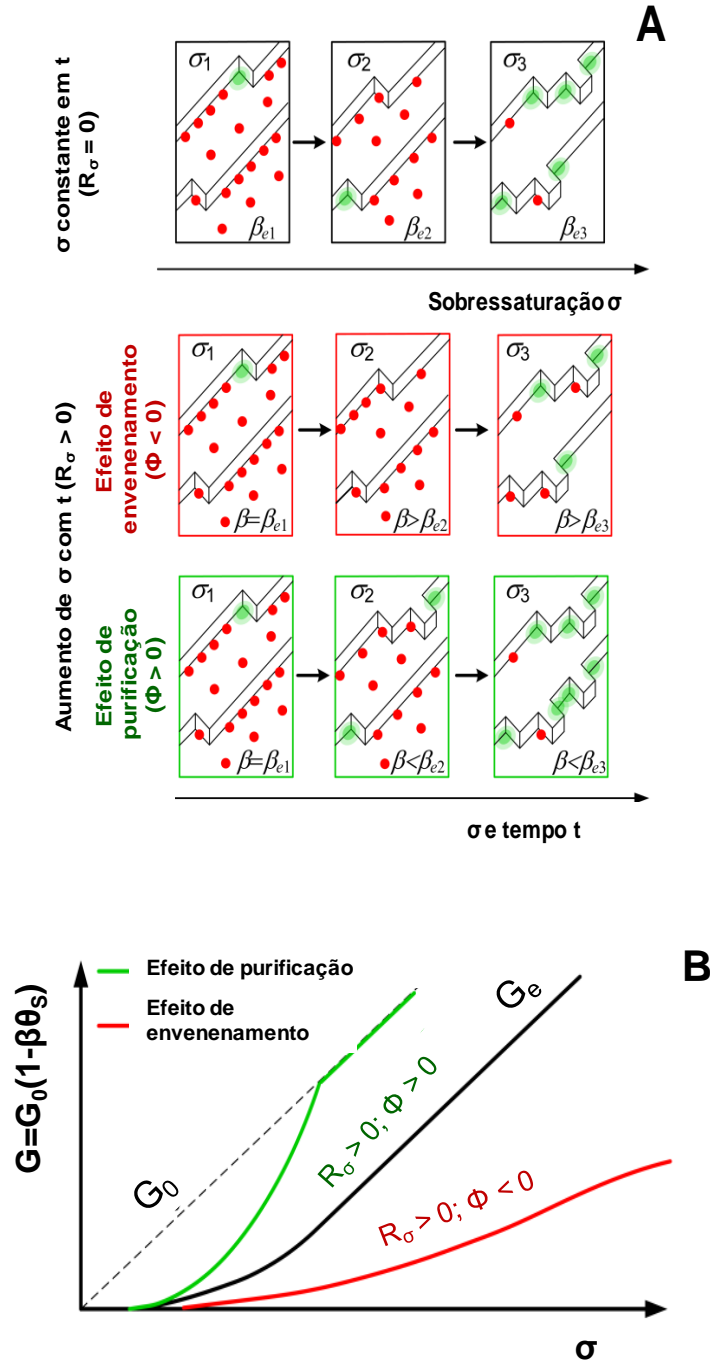


Figura 5.1: Ilustração esquemática do efeito de purificação e envenenamento causado pelo aumento de σ com o tempo ($R_\sigma > 0$).

O efeito de purificação atenua a incorporação de impurezas durante o crescimento cristalino, garantindo a obtenção de uma estrutura cristalina com elevada qualidade (Chayen & Saridakis, 2008; McPherson, 2004; Stamplecoskie et al., 2008; Thomas et al., 2004; Zaitseva & Carman, 2001; Zaitseva et al., 2011). Adicionalmente, as velocidades de crescimento cristalino podem ser aceleradas ao ponto de suprimir o

efeito inibidor dos contaminantes (Figura 5.1B, linha sólida verde). Este comportamento, denominado curva de crescimento tipo-3, tem sido observado numa variedade de sistemas (Rashkovich & Kronsby, 1997), nomeadamente, na recuperação de superfícies sujeitas a envenenamento de impurezas (Land et al., 1999), e na formação de cristais fisiológicos (Georgiou & Vekilov, 2006). Para elevados valores de σ , as curvas teóricas de G previstas pelo mecanismo clássico de *pinning* são praticamente paralelas à curva de G_0 e, por isso, não se enquadram nas curvas tipo-3 (Kubota et al., 2003).

5.2 Método Experimental

Experiências de Crescimento Cristalino

A lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) adquirida à *Merck* (lot K39757781937) foi usada sem purificação adicional para produzir cristais de HEWL pelo método de *hanging-drop* a 20 °C (para mais detalhes consultar tópico 3.2.1). Foram realizadas análises de SDS-PAGE a soluções de HEWL de baixa força iónica que revelaram níveis de pureza superiores a 98 % e cujo principal contaminante de elevado peso molecular eram dímeros de lisozima. Os ensaios de crescimento cristalino de HEWL decorreram na instalação experimental, apresentada na secção 3.1.

Os cristais produzidos foram recolhidos individualmente para uma célula de crescimento contendo 2.4 mL de 25 mg/mL de solução de proteína em 0.2 M de acetato de sódio a pH 4.7 e 3% (w/v) de cloreto de sódio, cobertos com óleo parafina para evitar a evaporação, conforme ilustrado na seguinte figura.

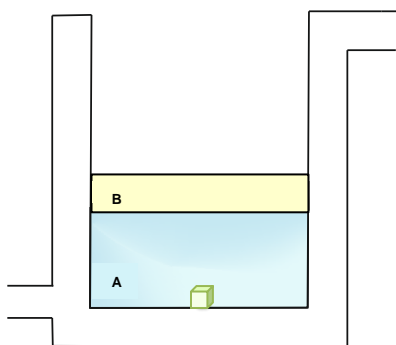


Figura 5.2: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de crescimento cristalino constituída por: A) 2.4 mL de solução sobressaturada de HEWL contendo um cristal em crescimento e B) 1 mL de óleo de parafina.

As experiências de crescimento eram compostas por um período inicial de estabilização de 80 minutos a 18 °C, seguido por dois períodos consecutivos com a mesma duração de aumento e diminuição linear da temperatura numa gama entre 18.0 e 22.0 °C. Foram testados diferentes períodos de aquecimento e arrefecimento, variando a duração de rampa entre 360 minutos ($R_{\Delta T} = 0.67$ °C/h) e 90 minutos ($R_{\Delta T} = 2.67$ °C/h). Um banho termostático *Huber ministat 125-cc-NR* foi usado para controlar a temperatura. O crescimento das faces {101} dos cristais de HEWL foi seguido usando um estereomicroscópio calibrado *Nikon SMZ1500* equipado com uma camera digital *Nikon DS-Ri1e* o programa *Nis-Elements BR 3*. O cristal foi posicionado no interior da célula com a aresta da face {101} dirigida perpendicularmente à lente da objetiva. O crescimento da normal ΔL da face {101} foi medido automaticamente usando o ângulo da face e a extensão do deslocamento (Guzman et al., 2001). As curvas de velocidade de crescimento G foram determinadas por ajustamento dos resultados ΔL versus ΔT a uma cinética de crescimento seguindo uma lei de potência.

5.3 Resultados e discussão

As velocidades de crescimento da face {101} dos cristais de HEWL foram determinadas com base nas medições de comprimento ΔL e sobrearrefecimento (ΔT) com o tempo. A temperatura (e ΔT) constante, as velocidades de crescimento em equilíbrio (G_e) foram diretamente obtidas a partir do declive de curva de ΔL versus

tempo. Tal como evidenciado nas inserções da Figura 5.3, este declive não varia significativamente com o tempo, mesmo nos casos em que o crescimento do cristal não é precedido por um período de estabilização. Uma vez que o número de locais ativos para o crescimento (n_T) não é afetado pela variação de ΔT , o equilíbrio de adsorção de impurezas é alcançado rapidamente. Os valores obtidos de G_e foram representados em função de ΔT , e ajustados a uma lei de potência:

$$\left. \frac{dL}{dt} \right|_{\Delta T} = G = k\Delta T^b \quad (5.9)$$

sendo k e b as constantes cinéticas. A Figura 5.3 mostra os resultados ajustados e o intervalo de confiança de 95% calculado recorrendo ao programa *Minitab 16 Statistical*. A temperatura de saturação T_e foi estimada para soluções de 25 mg/mL de HEWL e corresponde à temperatura acima da qual os cristais de lisozima iniciam a dissolução (27.4 °C).

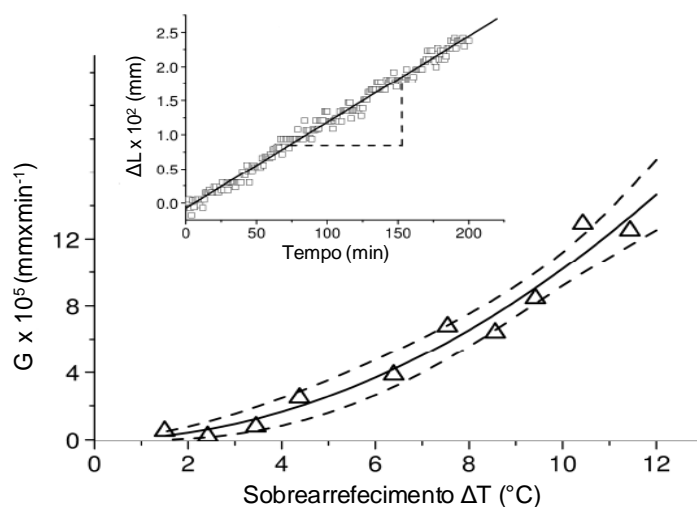


Figura 5.3: Determinação de velocidade de crescimento da face {101} dos cristais de HEWL a temperatura (e ΔT) constante. Inserções: a uma dado nível de ΔT , G_e é obtida pelo declive da curva de ΔL versus tempo. Os valores de G_e medidos estão representados em função de ΔT e ajustados pela equação 5.9 (linha sólida; curva G_e ; $k = 1.0 \times 10^{-6}$ mm/min e $b = 1.98$ para um intervalo de confiança a 95 % (linhas a tracejado).

Uma vez que ΔT varia a uma velocidade constante $R_{\Delta T}$, a velocidade G é dada pelo produto $R_{\Delta T} dL/d\Delta T$, pelo que da integração da equação 5.9 resulta:

$$\Delta L = \frac{k\Delta T_0^{b+1}}{R_{\Delta T}(b+1)} \left[\left(\frac{\Delta T}{\Delta T_0} \right)^{b+1} - 1 \right] \quad (5.10)$$

Esta equação foi usada para ajustar a variação de ΔL com ΔT durante períodos de aquecimento e arrefecimento (sobreaquecimento inicial de ΔT_0 de 9.4 e 5.4 °C, respetivamente), e assim, determinar os coeficientes cinéticos k e b que minimizavam a soma do quadrado dos erros. Numa primeira fase, foi avaliada a hipótese de curvas de G independentes do aumento ou diminuição de ΔT , determinando para isso o conjunto de coeficientes cinéticos que melhor ajustavam os períodos de aquecimento e arrefecimento. Para velocidades de variação de ΔT muito elevadas, não foi possível descrever os períodos de aquecimento e arrefecimento por uma única curva de ajuste. Por isso, as curvas de G foram determinadas separadamente para cada período.

Tabela 5.1: Parâmetros da equação 5.10 ajustados numericamente aos resultados representados na Figura 5.4.

Figura	$R_{\Delta T}$ (°C/h)	Período de aquecimento		Período de arrefecimento	
		k (mm/min)	b	k (mm/min)	b
5.4A	∓ 2.00	3.31×10^{-8}	3.52	3.31×10^{-8}	3.52
5.4B	∓ 2.67	5.85×10^{-6}	1.20	1.37×10^{-3}	-2.00
5.4C	∓ 2.67	3.46×10^{-4}	-0.73	0.00	0.00

O efeito de purificação é promovido quando $R_\sigma > 0$ (aumento contínuo da sobressaturação com o tempo) e $\phi > 0$ (quando a velocidade de formação de *kinks* depende fortemente de σ) – ver equação 5.8. De acordo com os exemplos mencionados na literatura, n_T aumenta significativamente com σ devido a um mecanismo de formação de *macrostep* (Georgiou & Vekilov, 2006; Land et al., 1999; Rashkovich & Kronsky, 1997). Porém, os ensaios de cristalização de HEWL revelaram que o efeito de purificação pode também ser observado quando $\phi < 0$, isto é, quando o aumento de n_T

com σ é menor que a diminuição de θ_s com o σ . Conforme evidenciado nas Figura 5.4B e C, o efeito de purificação foi presenciado quando σ diminuiu com o tempo ($R_\sigma < 0$), por outro lado, o aumento de σ conduziu à inibição do crescimento do cristal.

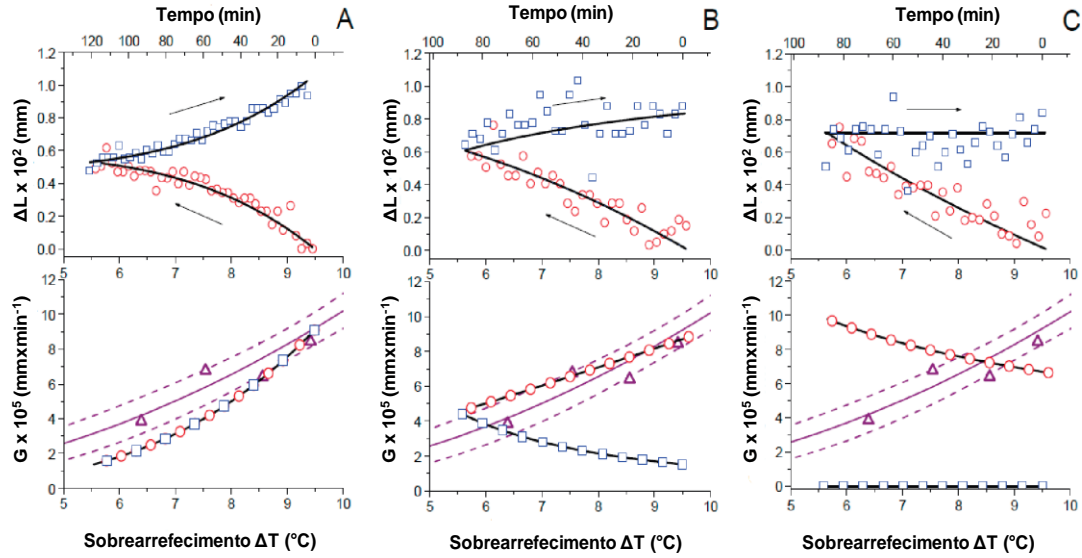


Figura 5.4: Cinéticas de crescimento da face {101} dos cristais de HEWL durante o período de aquecimento e de arrefecimento com alteração de $R_{\Delta T}$ de (A) ± 2.00 °C/h e (B, C) ± 2.67 °C/h.

Na Figura 5.4 estão apresentadas cinéticas de crescimento da face {101} dos cristais de HEWL durante períodos de aquecimento (círculos vermelhos) e de arrefecimento (quadrados azuis). Os diagramas de cima mostram o crescimento normal ΔL à face {101} em função de tempo e de ΔT (sobrearrefecimento) e as setas indicam o sentido da evolução do sistema. Os diagramas de baixo representam cinéticas de crescimento medidas a ΔT constante (triângulos roxos) ajustados por uma equação de potência (linha sólida roxa; curva G_e) para um intervalo de confiança de 95 % (linha a tracejado roxa), as linhas pretas representam as curvas de G determinadas por uma curva de ajuste, do tipo lei de potência, aos valores experimentais de ΔL .

A Figura 5.4A evidencia que períodos de aquecimento e arrefecimento longos (isto é, baixos valores de $R_{\Delta T}$) não induziram desvios significativos de G relativamente a velocidades de crescimento a temperaturas constantes (G_e) na gama de temperaturas considerada. As cinéticas de crescimento determinadas com $|R_{\Delta T}|$ igual a 0.67, 1.14 e 1.33 °C/h situaram-se dentro do intervalo de confiança de 95% da curva G_e . Nas Figura 5.4B e Figura 5.4C, observa-se que os efeitos de purificação e envenenamento ocorrem

para valores de $R_{\Delta T}$ superiores a 2.00 °C/h. A velocidade de crescimento G é significativamente superior a G_e durante o período de aquecimento, enquanto que no período de arrefecimento os cristais crescem muito lentamente (Figura 5.4B) ou param de crescer (Figura 5.4C). Este facto mostra que períodos de aquecimento e arrefecimento rápidos induzem o efeito de purificação durante o período de aquecimento (quando σ diminui) e o efeito de envenenamento durante o período de arrefecimento (quando σ aumenta). Ou seja, as variações de ΔT podem conduzir a fenómenos de histerese na velocidade de crescimento.

De acordo com a literatura, os dímeros e outros agregados de proteína são considerados a impureza dominante nos ensaios de crescimento cristalino (Carter et al., 1999; Wilson et al., 1996; Wilson et al., 2002). Recentemente, técnicas de microscopia avançada comprovaram dímeros ligados covalentemente podem inibir o crescimento de cristais de lisozima (Driessche et al., 2009; Yoshizaki et al., 2004). A análise SDS-PAGE de soluções com baixa concentração de HEWL e baixa força iónica confirmou a presença de <2 % de dímeros de lisozima como o principal contaminante de elevado peso molecular.

O sobrearrefecimento, ΔT , dado pela diferença entre a temperatura de saturação T_e e a temperatura de solução T , está diretamente relacionado com o nível da sobressaturação (Kubota et al., 2003):

$$\sigma \cong \frac{T_e - T}{T} = \frac{\Delta T}{T} \quad (5.11)$$

Nos ensaios experimentais, ΔT (ou σ) variou continuamente a uma velocidade constante por aumento ($R_{\Delta T, \sigma} < 0$) ou diminuição ($R_{\Delta T, \sigma} > 0$) linear da temperatura de soluções de HEWL. Os períodos longos de aquecimento e arrefecimento (isto é, valores baixos de $R_{\Delta T}$) não induziram a variações significativas de G relativamente à velocidade de crescimento a temperatura constante, G_e , numa gama de temperatura de 18.0 a 22.0 °C (ver Figura 5.4A). Apesar das constantes cinéticas serem muito diferentes, as curvas G determinadas a velocidades de variação de sobrearrefecimento $|R_{\Delta T}|$ de 0.67, 1.14, e 1.33 °C/h estão dentro do intervalo de confiança da curva G_e . Nestes casos, o cristal em crescimento apresenta curvas G muito semelhantes durante o período de

aquecimento e de arrefecimento. Assim, a variabilidade de coeficientes cinéticos observados de cristal para cristal pode ser explicada pela teoria de dispersão de velocidade de crescimento (Judge et al., 2010). A dispersão de velocidades de crescimento poderá também explicar as diferentes magnitudes dos efeitos promotores/inibidores observados nas Figura 5.4B e C.

Como previsto pela equação 5.7, à medida que $|R_{\Delta T}|$ aumenta, os valores transientes de β afastam-se do valor em estado estacionário, β_e . Isto é comprovado pela ocorrência dos efeitos de purificação e envenenamento a $R_{\Delta T} \geq 2.00$ °C/h (Figura 5.4B e C): durante o período de aquecimento G foi significativamente superior a G_e , ao passo que durante o período de arrefecimento, os cristais cresceram muito lentamente (Figura 5.4B) ou pararam de crescer (Figura 5.4C). Para $R_{\Delta T} = 2.00$ °C/h, existe alguma variabilidade de resultados, podendo os efeitos promotores/inibidores do crescimento estar presentes ou ausentes dependendo da história da velocidade de crescimento de cada cristal. Por esta razão, as medições de crescimento cristalino foram precedidas por um período preliminar de estabilização de 80 min a 18 °C.

O fenómeno de histerese em velocidades de crescimento cristalino, induzido pelo aumento ou diminuição de ΔT (e σ), foi primariamente descrito pelo investigador Kubota e seus colaboradores (Guzman et al., 2001; Kubota et al., 2003). As teorias existentes apresentam limitações que são superadas pelo modelo CAM (Martins et al., 2006). De fato, valores transientes de β distintos são previstos pela equação 5.7 para valores de $R_{\sigma}\phi$ positivos ou negativos. As diferenças tendem a ser mais pronunciadas para valores de $|R_{\sigma}\phi|$ próximos de 1. Prevê-se que os efeitos de inibição e promoção de crescimento sejam semelhantes para valores de $|R_{\sigma}\phi|$ muito elevados e quando as etapas de variação de σ são realizadas consecutivamente. Nestes casos, não existe histerese nas velocidades de crescimento.

5.4 Conclusões

O desenvolvimento do modelo CAM permitiu tirar conclusões interessantes não só do ponto de vista fundamental mas também prático. Este estudo destacou a velocidade de variação da sobressaturação R_σ como uma variável importante do processo que pode influenciar notoriamente o crescimento cristalino relativamente às condições de estado estacionário. Neste trabalho verificou-se que o crescimento de cristais de lisozima pode ser acelerado, retardado ou até mesmo suprimido, variando R_σ . Quando ocorre um atraso na adsorção de impurezas em *kinks*, a velocidade de crescimento do cristal aumenta, denominado efeito de purificação ($R_\sigma\phi > 0$). Por outro lado, se a dessorção de impurezas em *kinks* sofrer um atraso, é observado o efeito de envenenamento ($R_\sigma\phi < 0$). Com base neste raciocínio, é possível explicar fenômenos de histerese nas velocidades de crescimento e as curvas de crescimento tipo-3 presentes em diversos sistemas. O efeito purificador causado pelo retardamento da incorporação de impurezas pode ter um contributo importante na produção de redes cristalinas de elevada qualidade durante o crescimento de cristais. Em contrapartida, o efeito de envenenamento abre novas possibilidades para a inibição do crescimento de cristais durante a mineralização patológica.

5.5 Referências bibliográficas

- Cabrera, N., & Vermilyea, D. A. (1958). *In Growth and perfection of crystals*. (R. H. Doremus, B. W. Roberts, & D. Turnbull, Eds.) Wiley. New York.
- Carter, D. C., Lim, K., Ho, J. X., Wright, B. S., Twigg, P. D., Miller, T. Y., ... Chernov, A. A. (1999). Lower dimer impurity incorporation may result in higher perfection of HEWL crystals grown in microgravity A case study. *Journal of Crystal Growth*, 196, 623–637.
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5, 147–153.
- Davis, K. J., Doves, P. M., & Yoreo, J. J. De. (2000). The Role of Mg^{2+} as an Impurity in Calcite Growth. *Science*, 290, 1134–1137.

- Driessche, A. E. S. Van, Sazaki, G., Dai, G., Otálora, F., Gavira, J. A., Matsui, T., ... Nakajima, K. (2009). Direct Observation of Adsorption Sites of Protein Impurities and Their Effects on Step Advancement of Protein Crystals. *Crystal Growth & Design*, 9(7), 3062–3071.
- Georgiou, D. K., & Vekilov, P. G. (2006). A fast response mechanism for insulin storage in crystals may involve kink generation by association of 2D clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1681–1686.
- Guzman, L. A., Kubota, N., Yokota, M., Sato, A., & Ando, K. (2001). Growth Hysteresis of a Potassium Sulfate Crystal in the Presence of Chromium (III) Impurity 2001. *Crystal Growth & Design*, 1(3), 225–229.
- Judge, R. a., Forsythe, E. L., & Pusey, M. L. (2010). Growth Rate Dispersion in Protein Crystal Growth. *Crystal Growth & Design*, 10(7), 3164–3168.
- Kubota, N., & Mullin, J. W. (1995). A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity. *Journal of Crystal Growth*, 152, 203–208.
- Kubota, N., Yojota, M., Doki, N., Guzman, L. A., Sasaki, S., & Mullin, W. J. (2003). A Mathematical Model for Crystal Growth Rate Hysteresis Induced by Impurity. *Crystal Growth & Design*, 3(3), 397–402.
- Land, T. A., Martin, T. L., & Potapenko, S. (1999). Recovery of surfaces from impurity poisoning during crystal growth. *Nature*, 399, 442–445.
- Martins, P. M., Ferreira, A., Polanco, S., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2009). Unsteady-state transfer of impurities during crystal growth of sucrose in sugarcane solutions. *Journal of Crystal Growth*, 311(15), 3841–3848.
- Martins, P. M., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2011). Unsteady-state inhibition of crystal growth caused by solution impurities. *CrystEngComm*, 13, 1103–1110.
- Martins, P., Rocha, F. A., & Rein, P. (2006). The influence of impurities on the crystal growth kinetics according to a competitive adsorption model. *Crystal Growth & Design*, 6(12), 2814–2821.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34, 254–265.

- Meldrum, F. C., & Cölfen, H. (2008). Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chemical Reviews*, 108(11), 4332–4432.
- Meldrum, F. C., & Sear, R. P. (2008). Now you see them. *Science*, 322, 1802–1803.
- Pina, C. M. (2011). Inhibition of growth in solid solution–aqueous solution systems by non-incorporating impurities. *Surface Science*, 605(5–6), 545–550.
- Rashkovich, L. N., & Kronskey, N. V. (1997). Influence of Fe^{3+} and Al^{3+} ions on the kinetics of steps on the $\{100\}$ faces of KDP. *Journal of Crystal Growth*, 182, 434–441.
- Rimer, J. D., An, Z., Zhu, Z., Lee, M. H., Goldfarb, D. S., Wesson, J. A., & Ward, M. D. (2010). Crystal Growth Inhibitors for the Stones Through Molecular Design. *Science*, 330, 337–341.
- Stamplecoskie, K. G., Ju, L., Farvid, S. S., & Radovanovic, P. V. (2008). General control of transition-metal-doped GaN nanowire growth: toward understanding the mechanism of dopant incorporation. *Nano Letters*, 8(9), 2674–2681.
- Thomas, T. N., Land, T. A., Martin, T., Casey, W. H., & DeYoreo, J. J. (2004). AFM investigation of step kinetics and hillock morphology of the $\{100\}$ face of KDP. *Journal of Crystal Growth*, 260, 566–579.
- Vekilov, P. G. (2007). What Determines the Rate of Growth of Crystals from Solution? *Crystal Growth & Design*, 7(12), 2796–2810.
- Villeneuve, V. W. A. De, Dullens, R. P. A., Aarts, D. G. A. L., Groeneveld, E., Scherff, J. H., Kegel, W. K., & Lekkerkerker, H. N. W. (2005). Colloidal Hard-Sphere Crystal Growth Frustrated by Large Spherical Impurities. *Science*, 309(August), 1231–1233.
- Ward, M. D. (2005). Snapshots of Crystal Growth. *Science*, 308(5728), 1566–1567.
- Wilson, L. J., Adcock-Downey, L., & Pusey, M. L. (1996). Monomer concentrations and dimerization constants in crystallizing lysozyme solutions by dialysis kinetics. *Biophysical Journal*, 71, 2123–2129.
- Wilson, L. J., Kim, Y. W., & Baird, J. K. (2002). Lysozyme Self-Association in

Aqueous NaCl at pH 4.0 and 20 °C. *Crystal Growth & Design*, 2(1), 41–43.

Yoreo, J. J. De, & Dove, P. M. (2004). Shaping Crystals with Biomolecules. *Science*, 306(5700), 1301–1302.

Yoshizaki, I., Kadowaki, A., Limura, Y., Igarashi, N., Yoda, S., & Komatsu, H. (2004). Impurity effects on lysozyme crystal growth. *International Union of Crystallography*, 11, 30–33.

Zaitseva, N., & Carman, L. (2001). Rapid growth of KDP-type crystals. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 43(1), 1–118.

Zaitseva, N., Carman, L., Glenn, A., Newby, J., Faust, M., Hamel, S., ... Payne, S. (2011). Application of solution techniques for rapid growth of organic crystals. *Journal of Crystal Growth*, 314(1), 163–170.

6 Fenómeno de histerese na velocidade de crescimento e crescimento cristalino catastrófico

Conteúdo do Capítulo

No capítulo anterior os efeitos de envenenamento e purificação foram caracterizados de forma semi-empírica, com base numa lei de potência para determinação de velocidade de crescimento. Este capítulo concebe um entendimento mais estruturado sobre a ocupação de kinks por impurezas em estado não estacionário.

6.1 Introdução

A histerese na velocidade de crescimento (GRH) é um fenómeno abrangente a diversos sistemas, nomeadamente na formação de cristais de dihidrogenofosfato de potássio usados em lasers óticos (Guzman & Kubota, 2005; Punin & Artamonova, 1989; Vorontsov et al., 2003), na formação de cristais de gelo (Libbrecht, 2008), durante a bio-mineralização (Friddle et al., 2010), na produção farmacêutica do paracetamol (Shekunov et al., 1997) e também na cristalização de proteínas para aplicações cristalográficas (ver Capítulo 5). Comum a todos os casos está o fato da velocidade de crescimento cristalino a uma dada sobressaturação (σ), variar com a direção da variação de σ . Uma vez que não existe um processo comum de variação de σ , não é possível estabelecer um padrão generalizado para GRH. As etapas de aumento e diminuição de σ podem ser efetuadas alternadamente ou consecutivamente, adotando diferentes sequências e alterando as velocidades de variação de σ (R_σ).

Os trabalhos de Kubota e outros colaboradores forneceram uma melhor compreensão dos princípios de GRH, com o desenvolvimento do mecanismo de *pinning* de Cabrera e Vermilyea (Cabrera & Vermilyea, 1958) e ao considerar a adsorção de impurezas na superfície cristalina em estado não estacionário (Kubota, 2001; Kubota et al., 2003). Estes autores foram capazes de descrever, pelo menos qualitativamente, os resultados experimentais em GRH e os efeitos de R_σ , da concentração de impurezas (c_i)

e da sobressaturação inicial (σ_0) (Guzman & Kubota, 2005; Guzman et al., 2001; Kubota et al., 2003). Contudo, estes modelos experimentais apresentam limitações na descrição do crescimento cristalino catastrófico (CCG) (Guzman & Kubota, 2005; Kubota et al., 2003), um comportamento que consiste num súbito aumento (ou diminuição) de G provocado por um ligeiro aumento (ou diminuição) de σ (abordado na secção 6.3.2).

No passado recente, o modelo de adsorção competitiva (CAM) foi usado para explicar as curvas de crescimento cristalino Tipo-1 e Tipo-2 (Figura 6.1A), resultantes da ocupação de locais ativos por impurezas em estado estacionário (Martins et al., 2006).

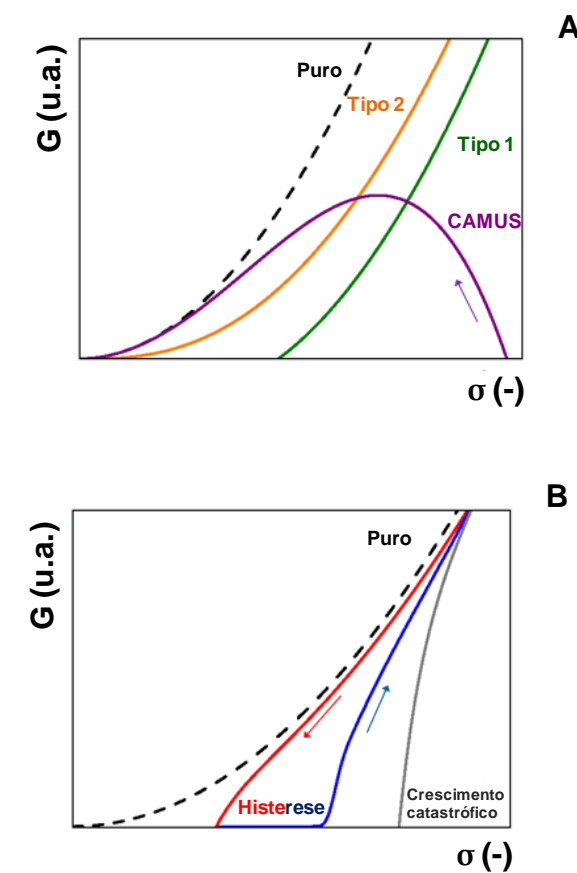


Figura 6.1: A) Influência teórica da sobressaturação σ na velocidade de crescimento cristalino em meio puro e na presença de impurezas descrita pelos modelos CAM e CAMUS. B) Fenómenos de crescimento cristalino catastrófico e de histerese visíveis em curvas G . As setas indicam a direção de variação de σ .

Num mecanismo que se assemelha à desativação de catalisadores por envenenamento, o efeito da redução de velocidade de crescimento aumenta diretamente com a fração de locais ativos ocupados por impurezas (θ_l):

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \theta_l \quad (6.1)$$

Onde G_0 é a velocidade de crescimento em condições puras.

Diferentemente do mecanismo *pinning*, o modelo CAM não se fundamenta na lei de Gibbs-Thomson para relacionar o efeito das impurezas no retardamento do crescimento com o raio de curvatura dos degraus emergentes. Em vez disso, assume-se que a velocidade do degrau atinge rapidamente o seu valor máximo quando é ultrapassada a dimensão crítica do degrau, tal como confirmado por recentes trabalhos em microscopia de força atômica (Chernov et al., 2005; Petrova et al., 2009; Rashkovich et al., 2006). Assim, a cessação completa do crescimento é observada quando todos os locais ativos de crescimento são ocupados ($\theta_l = 1$), ou seja, quando a distância média entre impurezas adsorvidas ao longo do degrau é mais pequena que o tamanho crítico do degrau. Considera-se que as impurezas são inicialmente adsorvidas à superfície segundo a isotérmica de Langmuir competitiva, e posteriormente ocupam posições de bloqueio ao longo do degrau. A forma da curva de crescimento teórica representada na Figura 6.1A denominada “CAMUS” foi atribuída à adsorção de impurezas à superfície dos cristais em estado não estacionário (ver Capítulo 0) (Martins et al., 2009; Martins et al., 2011). A versão de CAM em estado não estacionário (CAMUS) foi também usada para caracterizar a recuperação de faces cristalinas, anteriormente inibidas por impurezas (Martins et al., 2011; Sánchez-Pastor et al., 2006). Conforme já abordado no Capítulo 5, a investigação de fenómenos ainda pouco explorados, tais como casos de GRH, impulsionou a necessidade de um conhecimento mais aprofundado da constante de proporcionalidade β (também denominada fator de eficácia da impureza) que relaciona a superfície coberta por impurezas (θ_s) com θ_l :

$$\beta = \frac{\theta_l}{\theta_s} \quad (6.2)$$

Além de ser influenciada pela mobilidade das impurezas e pela afinidade à superfície cristalina, o valor de β é também afetado pelo número total de locais ativos para crescimento. Durante o crescimento cristalino a uma dada sobressaturação, a variação da velocidade de R_σ é acompanhada por variação de θ_s , devido à adsorção competitiva, e de n_T dada a formação dinâmica de *kinks*. Como consequência, a razão θ_l/θ_s irá variar a partir do valor de equilíbrio de β_e de acordo com a equação diferencial seguinte¹:

$$\frac{R_\sigma}{k_{-i}} \cdot \frac{d\beta}{d\sigma} = \beta_e - \beta \left(1 + \frac{R_\sigma}{k_{-i}} \phi \right) \quad (6.3)$$

Onde ϕ é o resultado da influência de σ em n_T e em θ_s :

$$\phi = \frac{d\ln(n_T)}{d\sigma} + \frac{d\ln(\theta_s)}{d\sigma} \quad (6.4)$$

e β_e é dada pela razão entre as constantes de velocidade de ligação (k_i) e de desprendimento das impurezas (k_{-i}) que vão sendo integradas e libertadas dos locais ativos para o crescimento. No Capítulo 5, ficou patente que o valor do produto de $R_\sigma \phi$ pode gerar diferentes perfis de crescimento, como por exemplo, as curvas de GRH e CCG apresentadas na Figura 6.1B.

Neste capítulo desenvolve-se o modelo CAM de forma a contemplar a formação dinâmica de *kinks* e poder estimar os perfis de ocupação de *kinks* por impurezas em estado não estacionário. Pretende-se que esta análise seja quantitativa, i.e., que os parâmetros do modelo possam ser determinados pelo ajuste das curvas teóricas a diversos tipos de resultados experimentais na presença de GRH e CCG.

Modelo adsorção competitiva integrando ocupação dinâmica de *kinks* (CAMKOD)

A ocupação de *kinks* por impurezas em estado não estacionário foi descrita pelo modelo CAMUS como uma consequência de cinéticas da adsorção competitiva à superfície (Martins et al., 2009, 2011). No entanto, a explicação de casos de GRH e CCG envolve não só a adsorção de impurezas à superfície mas também a formação

¹ A descrição detalhada encontra-se no Anexo A e no Capítulo 5

dinâmica de *kinks* (ver Capítulo 5). No modelo CAMKOD (proveniente do desenvolvimento do modelo CAM), a variável ϕ permite identificar qual o efeito da variação de sobressaturação predominante: a influência positiva de σ na formação de *kinks* ou a influência negativa na adsorção à superfície das impurezas (ver equação (6.4)). Ao passo que o efeito negativo de σ na adsorção de impurezas à superfície está bem descrito pela isotérmica competitiva de Langmuir, o efeito de σ em n_T tem sido objeto de estudo na literatura recente (Yoreo et al., 2009; Georgiou & Vekilov, 2006; Lovette & Doherty, 2012a, 2012b; Pina et al., 2009; Saldi et al., 2009; Vekilov, 2007; Vorontsov et al., 2011). Em particular, a condição de densidade constante de *kinks* ao longo do degrau, hipótese inicialmente colocada por Burton, Cabrera e Frank e sustentada nas energias de ligação das moléculas no cristal (Burton, Cabrera, & Frank, 1951), é apenas baseada num número limitado de sistemas e mecanismos de formação de *kinks* (Yoreo et al., 2009; Vekilov, 2007). A densidade total de *kinks* na superfície é determinada pela densidade de *kinks* ao longo dos degraus, mas também pela densidade de degraus (Vekilov, 2007). Para quantificar a variável ϕ , considerou-se que a energia necessária para a formação de crescimento de *hillocks* depende mais da sobressaturação do que a energia envolvida na formação de um *kink*. Assim, a variação de n_T com σ é predominantemente determinada pela densidade de degraus expressa em termos de concentração de espirais de tamanho crítico ou núcleos bidimensionais à medida que o crescimento do cristal se realiza por crescimento em espiral ou por mecanismos de nucleação bidimensional (2D) (Martins & Rocha, 2007; Ohara & Reid, 1973). Em qualquer dos casos, n_T é proporcional ao fator exponencial $\exp\left(-\frac{\Delta G_c}{k_B T}\right)$, onde ΔG_c é a barreira energética de ativação dada pela equação:

$$\frac{\Delta G_c}{k_B T} = \left(\frac{\varepsilon}{k_B T}\right)^2 \left(\frac{1}{\sigma}\right) \quad (6.5)$$

sendo ε uma constante relacionada com os fatores geométricos e propriedades interfaciais do núcleo 2D, e $k_B T$ o produto da constante de Boltzmann e da temperatura (Martins & Rocha, 2007; Ohara & Reid, 1973). Logo, a primeira definição de ϕ , dada pela equação 6.4, pode ser rescrita como:

$$\phi = \left(\frac{\varepsilon}{k_B T \sigma} \right)^2 - \frac{1}{K_2 + \sigma} \quad (6.6)$$

onde K_2 é uma combinação de constantes de adsorção competitiva a concentração constante de impurezas². Dependendo do sinal de ϕ obtido da equação 6.6, ou de forma mais geral dependendo do sinal do produto $R_\sigma \phi$ da equação 6.3, surgem resultados distintos do valor de fator de eficácia de impurezas (β) em estado não estacionário, e, consequentemente, do valor da ocupação de impurezas em locais ativos em estado não estacionário θ_l . De acordo com a equação 6.3, quando $R_\sigma \phi$ é positivo, prevê-se que variações nos níveis de sobressaturação conduzam ao efeito de purificação caracterizado por fatores de eficácia transitórios inferiores a β_e e, consequentemente, valores transitórios de θ_l inferiores aos existentes a σ constante. O efeito de purificação é atingido por diminuição da sobressaturação ($R_\sigma < 0$), quando a densidade de *kinks* varia pouco com a sobressaturação, ou seja, para valores mais baixos de $\frac{\varepsilon}{k_B T \sigma}$ e $\phi < 0$. Por outro lado, quando a densidade de *kinks* é muito dependente de σ , então $\phi > 0$ e o efeito de purificação ocorre por aumento dos níveis de sobressaturação ($R_\sigma > 0$). As outras duas combinações de valores de ϕ e R_σ que contribuem para produto negativo de $R_\sigma \phi$ são, por outro lado, associadas ao efeito de envenenamento no qual as impurezas são mais ativas quando σ varia. Também, de acordo com a equação 6.3, prevê-se que os efeitos de purificação e de envenenamento sejam mais fortes para velocidades de variação de σ mais elevadas (isto é, para valores mais elevados de $|R_\sigma|$). Além disso, é provável que a diferença entre comportamentos à medida que σ aumenta ou diminui seja mais acentuada para valores de $\left| R_\sigma \phi / k_{-i} \right|$ próximos de 1, que corresponde a casos de fenómenos de histerese (GRH) mais pronunciados.

Os cenários possíveis apontados pelo modelo CAMKOD foram testados nos resultados experimentais obtidos em ensaios de cristalização de lisozima da clara de ovo (HEWL) e descritos na literatura para diferentes sistemas de crescimento cristalino. A análise será dividida de acordo com o valor de ϕ :

Se a densidade de *kinks* é independente de σ , $\phi < 0$;

² Ver informação suplementar contida no Anexo A

Se a densidade de *kinks* é dependente de σ , $\phi > 0$.

As expressões analíticas simplificadas serão derivadas para cada caso e usadas posteriormente para ajuste aos dados experimentais. Os parâmetros do modelo CAMKOD obtidos serão entendidos como aproximações, uma vez que o principal objetivo é mostrar como casos inesperados de GRH e CCG podem ser descritos pelo novo modelo.

6.2 Método Experimental

Ensaio de crescimento

O crescimento das faces $\{101\}$ dos cristais de HEWL foi seguido conforme descrito anteriormente no Capítulo 5. A HEWL liofilizada (*Merck*, lot k40776381042) foi utilizada, sem purificação prévia, para produção de cristais pelo método de *hanging drop* a 20 °C (para mais detalhes consultar seção 3.2.1). A análise SDS-PAGE de solução de HEWL com baixa força iônica mostrou níveis de pureza acima de 98 %, sendo os dímeros de lisozima o principal contaminante de elevado peso molecular³. Os cristais produzidos foram extraídos individualmente para uma célula de crescimento encamisada contendo 2.4 mL de uma solução de HEWL a 25 mg/mL em 0.2 M de solução tampão de acetato de sódio a pH 4.7 e contendo 3% (w/v) de cloreto de sódio. A solução foi coberta com óleo de parafina para evitar a evaporação.

A observação do crescimento do cristal foi precedida por um período preliminar de estabilização de 80 min a $T_0 = 25.0$ °C ou 22.0 °C para normalizar a história de crescimento de cada cristal. Seguiu-se um período de 120 min ou 90 min de diminuição linear da temperatura (T) até atingir 18.0 °C, e um outro de aumento linear de temperatura com a mesma duração até retornar a T_0 (linha a sólido da Figura 6.2). Os replicados foram realizados submetendo o mesmo cristal a 2 ciclos de temperatura compreendidos pelos mesmos períodos de estabilização, arrefecimento e aquecimento. Foram estudadas diferentes velocidades de variação de σ (rápida, intermédia e lenta), alterando a velocidade de variação linear da temperatura por combinação de diferentes temperaturas iniciais (T_0) e de diferentes durações de rampa (t_1). No exemplo dado na

³Consultar Capítulo 5

Figura 6.2, $T_0 = 25.0\text{ °C}$ e $t_1 = 120\text{ min}$ correspondem aos perfis intermédios. Perfis mais rápidos foram impostos por diminuição de valor de t_1 para 90 min e mantendo $T_0 = 25.0\text{ °C}$. Perfis mais lentos foram impostos adotando, $T_0 = 22.0\text{ °C}$ e $t_1 = 120\text{ min}$.

O nível de sobressaturação está diretamente relacionado com o grau de sobrearrefecimento ΔT , dado pela diferença entre a temperatura de saturação T_e , estimada como a temperatura máxima acima da qual os cristais de HEWL começam a dissolver (27.4 °C) (ver Capítulo 5), e a temperatura da solução T : $\sigma \cong (T_e - T)/T$. Conforme descrito na Figura 6.2, os perfis de variação linear de T (linha sólida) correspondem aproximadamente a perfis de variação lineares de σ (linha a tracejado) com valores constantes de R_σ de ± 0.288 , ± 0.214 e $\pm 0.139\text{ h}^{-1}$ durante perfis rápidos, intermédios e lentos, respetivamente.

O crescimento linear medido foi convertido em crescimento do comprimento perpendicular à face {101} da HEWL (ΔL) usando os valores medidos do ângulo da face (Guzman et al., 2001). O controlo da temperatura foi feito dentro da precisão $\pm 0.1\text{ °C}$.

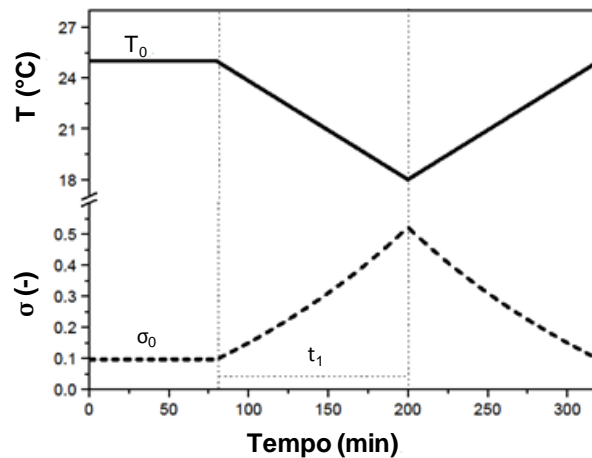


Figura 6.2: Exemplo de perfis de temperatura T (linha sólida) e de sobressaturação σ (linha a tracejado) adotados durante a observação de cristais de HEWL em crescimento a diferentes velocidades de variação de σ (R_σ).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Densidade de *kinks* independente de σ ($\phi < 0$)

Os efeitos de purificação e de envenenamento foram observados quando σ diminuía e aumentava, respetivamente. Este facto sugere que o parâmetro ϕ assume valores negativos durante o crescimento cristalino de HEWL em soluções impuras, cuja a impureza dominante são dímeros de lisozima (Capítulo 5). Logo, o valor da densidade de *kinks* depende menos de σ do que o valor da superfície adsorvida (equação 6.4). Supondo que estas diferenças são suficientemente contrastantes para assumir n_T constante, então é possível eliminar o termo positivo da equação 6.6 e derivar a expressão analítica de CAMKOD para cobertura de locais ativos durante o aumento e diminuição de σ (θ_{l+} e θ_{l-}):

$$\begin{aligned} \theta_{l+} = & \theta_0 \exp[-k_R(\sigma - \sigma_0)] \\ & + k_R K_1 \exp[-k_R(\sigma - K_2)] (E_i[k_R(\sigma + K_2)] \\ & - E_i[k_R(\sigma_0 + K_2)]) \end{aligned} \quad (6.7)$$

$$\begin{aligned} \theta_{l-} = & \theta_1 \exp[k_R(\sigma - \sigma_1)] \\ & + k_R K_1 \exp[k_R(\sigma + K_2)] (E_1[k_R(\sigma + K_2)] \\ & - E_1[k_R(\sigma_1 + K_2)]) \end{aligned} \quad (6.8)$$

Onde k_R é dado pela razão $|k_{-i}/R_\sigma|$, K_1 e K_2 são combinações das constantes de adsorção competitiva à superfície e o fator de eficácia em equilíbrio β_e , e E_1 e E_i são funções integrais exponenciais⁴.

Considerando o período de estabilização que precede a rampa de aumento de σ , a ocupação inicial dos sítios ativos corresponde ao valor em equilíbrio $\theta_0 = K_1/(K_2 + \sigma_0)$. À medida que as etapas evoluem consecutivamente, a condição de continuidade estabelece que o valor final de θ_{l+} , obtida da equação 6.7 para $\sigma = \sigma_1$, corresponda ao valor de θ_{l-} no início da rampa de diminuição de σ (θ_1 na equação 6.8).

⁴ Para mais detalhes considerar a informação no Anexo A

Na Figura 6.3A considera-se que o crescimento cristalino em soluções puras segue uma cinética de primeira ordem ($G_0 = k_0\sigma$) com $k_0 = 4.0 \times 10^{-4}$ mm/min (linha a tracejado, eixo à esquerda). Na mesma figura são apresentadas as velocidades de crescimento medidas a temperatura constante (e σ constante) em soluções impuras com 25 mg/mL de HEWL, $G_e = 2.46 \times 10^{-4}\sigma^{1.61}$ mm/min (Capítulo 5) (linha contínua, eixo à esquerda). São ainda representados os valores de cobertura de locais ativos em equilíbrio, obtidos a partir da equação 6.1, $\theta_e^{-1} = 1 - G_e/G_0$ (linha contínua, eixo à direita; os símbolos são usados para identificar os pontos experimentais em B). Na Figura 6.3B, está apresentada a relação linear entre θ_e e σ ($\theta_e = K_1^{-1}\sigma + K_2K_1^{-1}$), ajustada aos pontos experimentais obtidos na Figura 6.3A. Os valores de $K_1 = 0.75$ e $K_2 = 0.78$ foram calculados a partir do declive e da intersecção da linha de ajuste.

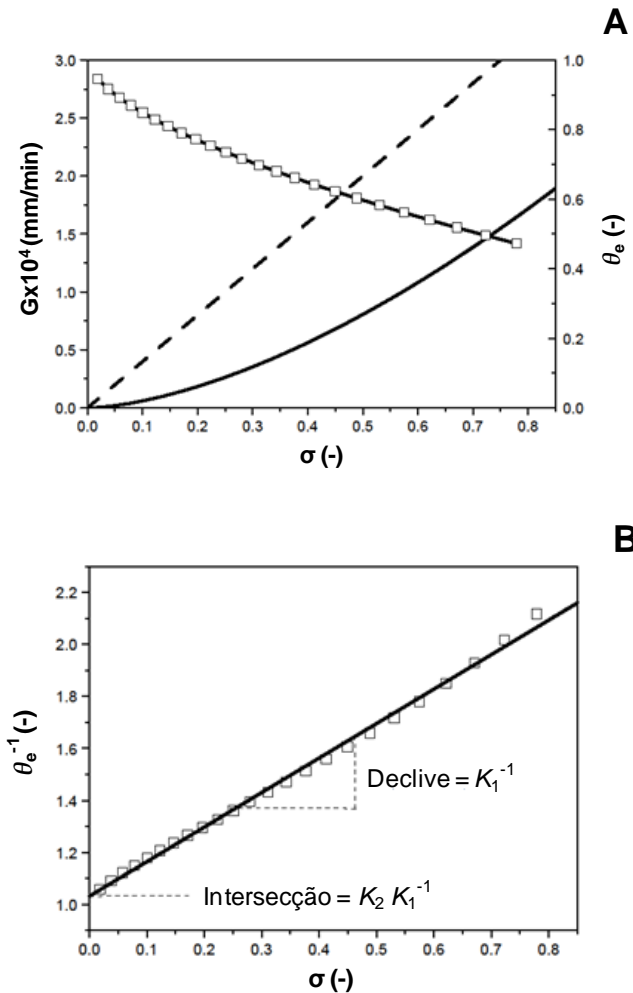


Figura 6.3: Parâmetros K_1 e K_2 obtidos a partir de velocidades de crescimento da das faces {101} de cristais de HEWL em soluções puras (G_0) e impuras em condições de estado estacionário (G_e).

A Figura 6.3 mostra que os parâmetros K_1 e K_2 podem ser diretamente obtidos conhecendo a constante da velocidade de primeira ordem para crescimento cristalino em soluções puras (k_0). Assim, são necessários apenas dois parâmetros, k_R e k_0 , para determinar os perfis de θ_{l+} e θ_{l-} em estado não estacionário, a partir dos quais podem ser calculados as velocidades de crescimento e os deslocamentos na direção normal:

$$G_{\pm} = k_0 \sigma (1 - \theta_{l\pm}) \quad (6.9)$$

$$R_{\sigma} \cdot \frac{d\Delta L_{\pm}}{d\sigma} = G_{\pm} \quad (6.10)$$

A integração numérica da equação 6.10 usando as definições de $\theta_{l\pm}$ e G_{\pm} , dadas pelas equações 6.7-6.9, foi implementada no programa *Microsoft Excel* recorrendo ao método do retângulo. O crescimento dos deslocamentos teóricos ΔL_+ (calculado entre σ_0 e σ_1) e ΔL_- (calculado entre σ_1 e σ_0) foram então ajustados às medições de variação de ΔL com σ , escolhendo os valores de k_R e k_0 que minimizavam a soma do quadrado dos erros.

Esta abordagem está apresentada graficamente na Figura 6.4. A cobertura de locais ativos por impurezas em estado não estacionário, calculada a partir das equações 6.7 e 6.8, foi usada para avaliar os perfis teóricos ΔL versus σ durante o aumento (linha azul da Figura 6.4) e a diminuição (linha vermelha da Figura 6.4) de σ . Para a cobertura de locais ativos em estado estacionário, o crescimento na direção normal (ΔL_e) (linha verde na Figura 6.4) foi obtido por integração da equação 6.10 recorrendo à lei de velocidade de crescimento: $\Delta L_e = 9.42 \times 10^{-5} R_{\sigma}^{-1} (\sigma^{2.61} - \sigma_0^{2.61})$ (mm), com a velocidade de variação de σ em min^{-1} . Após um primeiro conjunto de resultados ajustados, verificou-se que os valores medidos de ΔL (símbolos da Figura 6.4) são mais baixos que ΔL_e , e que podem ser descritos pelos valores teóricos de ΔL em estado não estacionário, usando um valor médio de $k_0 = 4.00 \times 10^{-4}$ mm/min, que na Figura 6.3 corresponde a valores de K_1 e K_2 de 0.75 e 0.78, respetivamente. Prevê-se que k_R , o último parâmetro de CAMKOD a ser determinado, aumente linearmente com a

velocidade de variação de σ , R_σ . Esta tendência é confirmada nas Figuras 6.4A e B que abordam os casos de variação de σ mais rápida e intermédia.

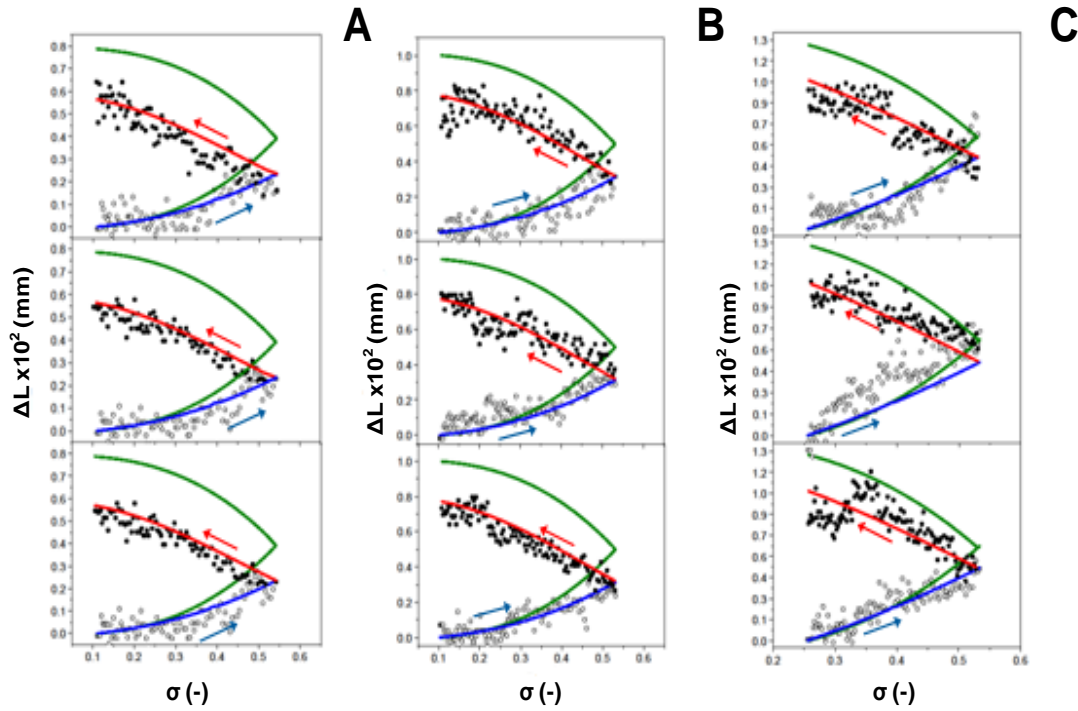


Figura 6.4: Evolução do crescimento da normal ΔL da face $\{101\}$ de HEWL durante velocidades de variação de σ (A) rápida, (B) intermédia e (C) lenta, em ensaios realizados em triplicado. As setas indicam a direção de variação de σ .

No primeiro caso ($|R_\sigma| = 0.288 \text{ h}^{-1}$), foi determinado um valor médio de $k_R \cong 3$ por ajuste das etapas de aumento e diminuição de σ em três replicados experimentais. À medida que $|R_\sigma|$ diminuiu para uma velocidade intermédia de 0.214 h^{-1} , o valor ajustado de k_R correspondente aumentou para ~ 4 . Ambos os resultados sugerem um valor para a constante de velocidade de desprendimento $k_{-i} = k_R |R_\sigma|$ de $\sim 0.86 \text{ h}^{-1}$. Além disso, a Figura 6.4C mostra que os resultados ajustados são diferentes dos ensaios com variação de σ mais rápida e intermédia. As velocidades de R_σ mais lentas devem conduzir a elevadas constantes de k_R , no entanto o valor ajustado foi inferior a 4 em todos os replicados. Para $R_\sigma = \pm 0.139 \text{ h}^{-1}$, o valor obtido de $k_R \cong 1$ corresponde a $k_{-i} \cong 0.14 \text{ h}^{-1}$. Admite-se que a simplificação adotada durante a derivação das equações 6.7 e 6.8 possa explicar o fato das constantes de velocidade de desprendimento obtidas em diferentes condições não serem totalmente concordantes. Em particular, (i) a condição de adsorção instantânea à superfície por impurezas é difícil

de comprovar considerando que as velocidades de crescimento medidas a σ constante necessitam de um período preliminar de estabilização antes de serem alcançados os valores de equilíbrio, G_e (ver Capítulo 5). Isto é especialmente relevante uma vez que o resultado discrepante de k_{-i} foi obtido em ensaios que partiram de diferentes valores de T_0 e σ_0 (ver Figura 6.2), e consequentemente iniciarem com diferente coberturas de superfície e de locais ativos.

Embora as constantes ajustadas k_0 , K_1 e K_2 estejam em concordância com todas as condições analisadas, também é possível que (ii) o cristal em crescimento num sistema puro não siga a cinética de primeira ordem e que (iii) a densidade de *kinks* não seja completamente independente de σ . A dispersão de velocidades de crescimento manifestada por variabilidade dos coeficientes cinéticos de cristal para cristal foi previamente observada em sistemas de HEWL (ver Capítulo 5). Independentemente das suposições e aproximações consideradas, o modelo CAMKOD é capaz de descrever qualitativamente e quantitativamente as diferenças entre o comportamento de crescimento cristalino em condições de estado estacionário e não estacionário, apresentadas na Figura 6.4.

Na Figura 6.5 estão representadas as velocidades de crescimento durante o aumento de σ , G_+ (linhas azuis), e a diminuição de σ , G_- (linhas vermelhas) calculadas a partir da equação 6.9, recorrendo às definições de θ_{l+} e θ_{l-} dadas pelas equações 6.7 e 6.8, respetivamente. As constantes k_0 , K_1 , K_2 e k_R foram ajustadas aos resultados experimentais representados em (A) Figuras 6.4 (A)-(B). As curvas de velocidade de crescimento em equilíbrio obtidas a σ constante são dadas como uma referência, $G_e = 2.46 \times 10^{-4} \sigma^{1.61}$ mm/min (ver Capítulo 5) (linha verde da Figura 6.5).

Os parâmetros do modelo CAMKOD, obtidos para valores altos e intermédios de R_σ , configuram um caso de GRH em que G tende para valores inferiores a G_e à medida que σ aumenta (efeito de envenenamento) e mais elevados que G_e à medida que σ diminui (efeito de purificação) (ver Figuras 6.5 (A) e (B)). Quando os valores de k_R são mais baixos e a gama de variação de σ é mais estreita, o fenómeno de GRH é menos acentuado (ver Figura 6.5 (C)).

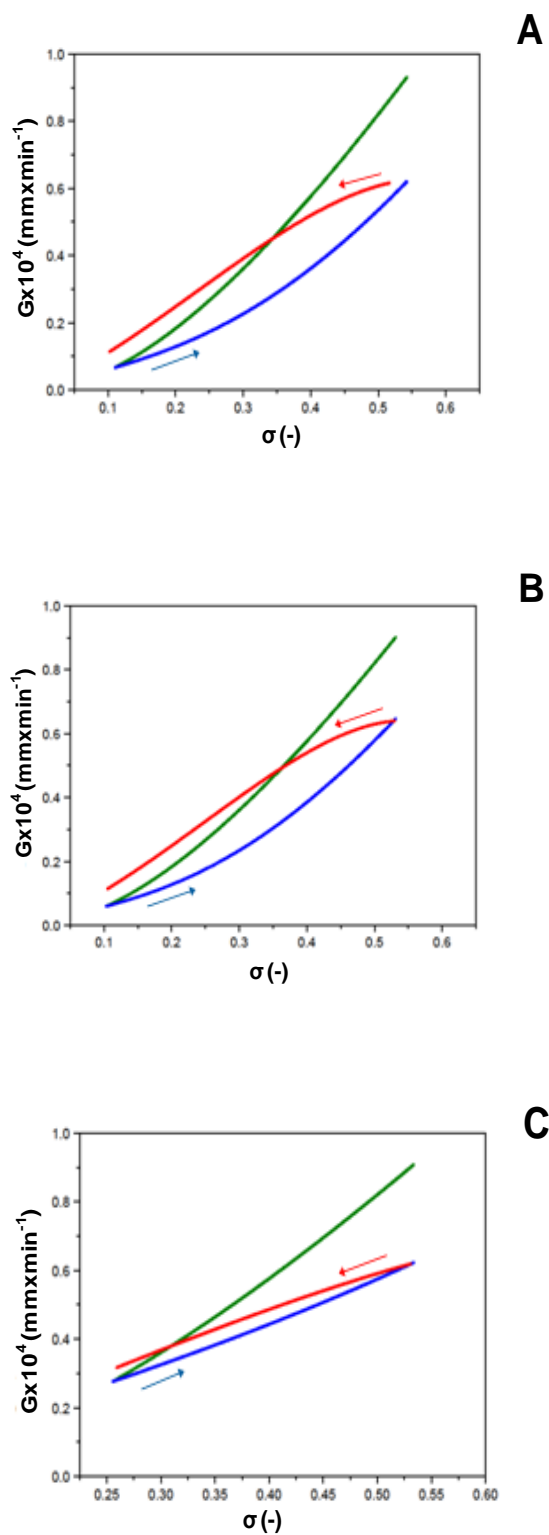


Figura 6.5: Influência da sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) da faces $\{101\}$ dos cristais de HEWL determinada em ensaios com velocidade de variação de σ (A) rápida, (B) intermédia e (C) lenta. As setas indicam a direção de variação de σ .

6.3.2 Densidade de *kinks* dependente de σ ($\phi > 0$)

O modelo CAMKOD foi também aplicado aos casos em que a densidade de *kinks* aumenta com σ . Nesta situação, o modelo CAMKOD foi testado usando dados experimentais distintos que têm em comum a inibição do crescimento cristalino provocada pela presença de impurezas em concentrações vestigiais. Dado que a concentração de impurezas é muito baixa, a extensão da adsorção na superfície do cristal deverá também ser reduzida. A menos que as impurezas sejam muito ativas, valores baixos de θ_s deveriam corresponder a uma baixa ocupação de locais ativos (baixo θ_l) e a um menor abrandamento das velocidades de crescimento (equação 6.1). Surpreendentemente, estes efeitos são observados de forma muito notória em exemplos da literatura quando ocorre uma diminuição de σ com o tempo. Com o objetivo de fornecer a explicação para este fenómeno, assumir-se-á que a adsorção à superfície é muito baixa ao longo da gama de σ considerada. A expressão para variações de θ_l em estado não estacionário é obtida a partir da equação 6.3 e das definições de β , θ_s e ϕ (ver Anexo A):

$$\frac{R_\sigma d\theta_l}{k_{-i} d\sigma} = \beta_e \theta_s - \theta_l \left(1 + \frac{R_\sigma}{k_{-i}} \left(\frac{\varepsilon}{k_B T} \right)^2 \frac{1}{\sigma^2} \right) \quad (6.11)$$

Este resultado pode ser simplificado considerando que a contribuição de $\beta_e \theta_s$ é desprezável, ou seja, a inibição do crescimento cristalino apenas ocorre em condições de não equilíbrio. A validade desta aproximação pode ser confirmada pela medição de velocidade de crescimento a σ constante ou na presença de variações lentas de σ , pois nestas condições o efeito de impurezas é pouco expressivo. A equação diferencial simplificada é então resolvida sujeita à condição inicial $\theta_l(\sigma_0) = \theta_0$ para obter:

$$\theta_{l\pm} = \theta_0 \exp \left[\mp k_R (\sigma - \sigma_0) + \left(\frac{\varepsilon}{k_B T} \right)^2 \left(\frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\sigma_0} \right) \right] \quad (6.12)$$

onde o sinal subscrito indica aumento (+) ou diminuição (-) de σ , e k_R é definido como a razão $|k_{-i}/R_\sigma|$.

O primeiro exemplo da literatura usado para testar a equação 6.12 foram os dados experimentais de Shekunov e Grant durante o crescimento cristalino de paracetamol numa solução de elevada pureza (Shekunov et al., 1997). A Figura 6.6 mostra a ocorrência de GRH em cristais cujo crescimento é mais rápido quando σ aumenta do que quando σ diminui. Isto é um indicativo que a energia imposta na formação de *kinks* assume um papel importante na determinação dos valores do parâmetro $\phi > 0$ (ver Capítulo 5). Embora as soluções sobressaturadas fossem preparadas recorrendo a paracetamol submetido a sucessivas cristalizações (Shekunov et al., 1997), as cinéticas não lineares obtidas por diminuição de σ são uma consequência do efeito das impurezas no crescimento cristalino. A presença de impurezas vestigiais foi assumida pelos autores, os quais adotaram um aumento progressivo de σ durante as suas medições, de modo a reduzir a incerteza associada à histerese (Shekunov et al., 1997). À luz do modelo CAMKOD, este procedimento é correto dado que θ_{l+} tende a diminuir a partir do valor inicial de θ_0 à medida que σ aumenta com o tempo (equação 6.12). À medida que θ_0 assume valores mais baixos será necessário um aumento drástico de θ_l para produzir um efeito de abrandamento na velocidade de crescimento. De acordo com a equação 6.12, este efeito de envenenamento pode ser induzido pela rápida diminuição de σ que conduz a elevados valores de R_σ e reduz o peso do termo dependente de k_R no argumento exponencial. Se adicionalmente $\varepsilon/k_B T$ assumir valores elevados, então θ_{l-} deverá aumentar rapidamente a partir de θ_0 até valores próximos de 1 causando a cessação do crescimento. Esta hipótese é aparentemente validada pelos resultados experimentais representados na Figura 6.6, os quais são descritos corretamente pelo modelo CAMKOD usando $k_R = 0.1$ e $(\varepsilon/k_B T)^2 = 7$ na equação 6.12. A partir do valor estimado de ε , a tensão interfacial γ pode ser determinada para uma dada geometria de núcleo 2D. Adotando a definição $\varepsilon = \sqrt{\pi} \gamma d_m^2$, com d_m sendo o diâmetro molecular (Worlitschek & Mazzotti, 2004), e usando $T = 303$ K e $d_m = 7.18 \times 10^{-10}$ m, obteve-se uma estimativa de $\gamma = 12$ mN/m, superior aos resultados de $\gamma = 1.8$ mN/m obtidos em ensaios de nucleação de paracetamol (Hendriksen & Grant, 1995; Prasad et al., 2001). Independentemente dos diferentes métodos empregues para determinar γ , o valor obtido é específico das faces $\{101\}$ do cristal de paracetamol, um sistema que apresenta notória anisotropia de face para face (Heng et al., 2006). A curva teórica de velocidade de crescimento quando σ diminui (linha a vermelho na Figura 6.6) foi calculada

escolhendo uma estimativa de $\theta_0 = 0.01$, coerente com valores equivalentes de G_- e G_0 no início do ensaio. No caso das curvas de G quando σ aumenta (linha a azul na Figura 6.6), a escolha de θ_0 na gama $[0, 1]$ não tem influência significativa nos valores de G_+ , que se prevê que sejam muito próximos de G_0 ($\theta_{l+} \cong 0$). Também neste caso, o valor de $\sigma_0 = 0.0748$ corresponde a sobressaturação crítica abaixo da qual não ocorre crescimento cristalino. Esta zona de não crescimento a partir do qual as experiências se iniciam é provavelmente causada pela elevada energia de ativação para crescimento da face $\{101\}$ dos cristais paracetamol (Shekunov et al., 1997). De um ponto de vista físico, o efeito drástico de envenenamento provocado pela diminuição de σ é explicado pela libertação lenta de impurezas dos *kinks*. Em sistemas caracterizados por $\phi > 0$, esta etapa é ultrapassada pela velocidade de extinção de locais ativos à medida que a força motriz para a sua formação diminui. Uma vez que n_T diminui mais rapidamente que n_i , quando $n_T \cong n_i$ pára o crescimento cristalino.

O primeiro caso de crescimento cristalino catastrófico (CCG) descrito pelo modelo CAMKOD está presenciado na Figura 6.6, quando ocorre uma repentina diminuição de G provocada pela diminuição ligeira de σ (linha a vermelho). O adjetivo “catastrófico” tem um significado duplo: refere-se à rapidez do processo e às consequências ruinosas em termos de produção de cristais, mesmo em soluções de elevada pureza.

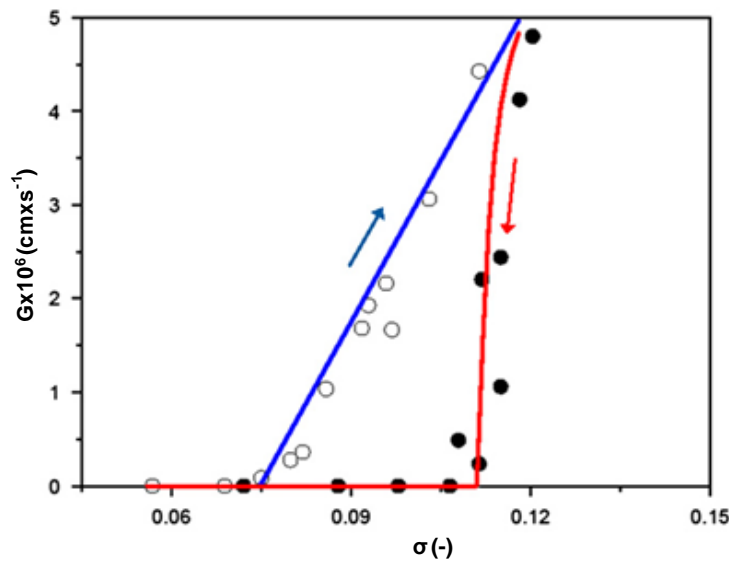


Figura 6.6: Influência de sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) das faces $\{101\}$ de cristais de paracetamol, medida por interferometria a laser *in situ* ao longo de

ensaios de aumento (círculos abertos) e diminuição (círculos a cheio) de σ (Shekunov et al., 1997). As setas indicam a direção da variação de σ em dois ensaios independentes.

A equação 6.12 foi ajustada aos dados da literatura usando as definições de cobertura de locais ativos para aumento de σ (θ_{l+}) e diminuição de σ (θ_{l-}) dadas na equação 6.1. Conforme mostra a Figura 6.6, os resultados correspondentes ao aumento de σ foram utilizados para ajustar uma linha reta que se aproxima da curva de velocidade de crescimento (G) em soluções puras: $G_0 = 1.15 \times 10^{-4}(\sigma - 0.074)$ (cm/s). Esta linha está sobreposta ao ajuste da curva G para aumento de σ (linha a azul da Figura 6.6), indicando que, neste caso, a inibição de crescimento não é promovida pela variação de σ com o tempo. Em contraste, o ajuste da curva G na etapa de diminuição de σ , (linha a vermelho da Figura 6.6) indica a existência de um efeito das impurezas fortemente pronunciado. As curvas G em estado não estacionário foram calculadas usando $\varepsilon/k_B T = 7$ e $k_R = 0.1$. Quando σ aumenta, a curva G é insensível ao valor inicial de θ_l , na gama $[0,1]$. Por outro lado, quando σ diminui, a curva G é calculada usando $\theta_0 = 0.01$ para uma sobressaturação inicial de $\sigma_0 = 0.12$. Para este conjunto de parâmetros CAMKOD, a sobressaturação crítica é estimada como $\sigma_c = 0.111$, assumindo $\theta_{l-} = 1$ na equação 6.12 e resolvendo em ordem a σ . Abaixo de σ_c , a velocidade de crescimento é nula.

Dos trabalhos de Kubota e seus colaboradores, foi selecionado um caso de GRH e CCG observado durante o crescimento cristalino de sais inorgânicos em soluções aquosas contendo crómio (III) como impureza ativa (Guzman & Kubota, 2005; Guzman et al., 2001). As velocidades de crescimento de cristais de sulfato de potássio apresentadas na Figura 6.7 foram obtidas na presença de 0.5 ppm de Crómio (III) cujo efeito inibidor foi praticamente nulo quando G foi medida a valores de σ constantes e superiores a 0.094 (Guzman et al., 2001). No entanto, quando o sobrearrefecimento (e σ) varia a uma velocidade suficientemente elevada, ocorre inibição de crescimento pronunciada e supressão de crescimento. Estas observações sustentam (i) um mecanismo não estacionário de ocupação de *kinks* por impurezas e (ii) a condição de $\beta_e \theta_s$ desprezável na equação 6.11. De forma a induzir a histerese, a um período de aumento linear de T até ao sobrearrefecimento crítico, seguiu-se um outro com a mesma duração no qual o valor de T diminuía linearmente até atingir a temperatura inicial. Os cristais cresceram inicialmente em solução pura para depois crescerem em solução

contaminada (Guzman et al., 2001). Os ciclos de aquecimento/arrefecimento foram adotados para ambas as soluções, mas a GRH foi apenas identificada na presença de crómio (III) - Figura 6.7.

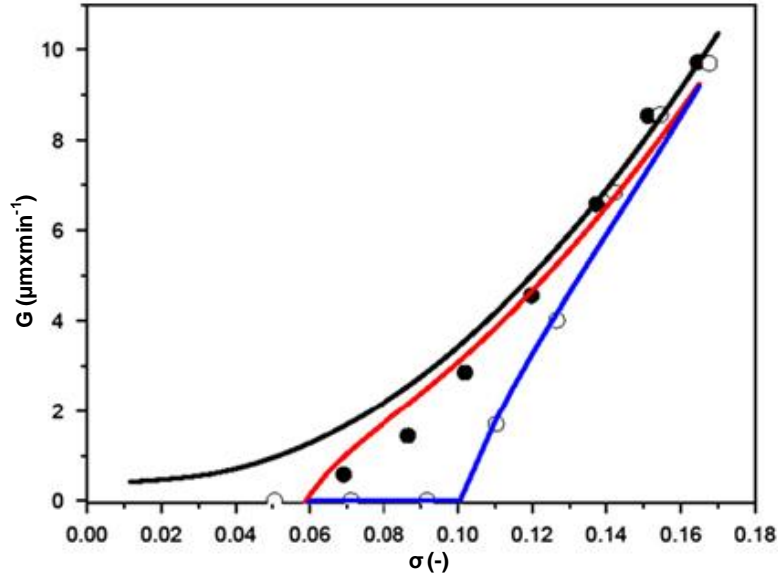


Figura 6.7: Influência da sobressaturação σ na velocidade de crescimento (G) das faces {101} de cristais de sulfato de potássio, medida por microscopia ótica em ensaios de diminuição (círculos a cheio) e aumento (círculos abertos) de σ em soluções puras (linha a preto) e na presença de impurezas (círculos) a uma velocidade de variação do sobrearrefecimento de $\pm 0.2 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ (Guzman et al., 2001).

As curva G representadas na Figura 6.7 foram obtidas convertendo os dados de G versus sobrearrefecimento (Guzman et al., 2001) em G versus σ , assumindo que $\sigma \cong (T_e - T)/T$ e $T_e = 48 \text{ } ^\circ\text{C}$. A equação 6.12 foi então ajustada aos dados experimentais. As velocidades de crescimento em soluções puras foram aproximadas a uma equação polinomial $G_0 = 416.7\sigma^2 - 12.841\sigma + 0.5086 \text{ (}\mu\text{m/min)}$ (linha a preto da Figura 6.7). As curvas de G para aumento (linha a azul da Figura 6.7) e diminuição (linha a vermelho da Figura 6.7) de σ em estado não estacionário foram calculadas usando estimativas do valor inicial de θ_{l-} e valor final de θ_{l+} de $\theta_0 = 0.05$ para uma sobressaturação inicial/final de $\sigma_0 = 0.168$. Os parâmetros CAMKOD ajustados foram $(\varepsilon/k_B T)^2 = 0.45$ e $k_R = 0.18$. A sobressaturação crítica para diminuição e aumento de σ foram estimados como $\sigma_{c-} = 0.059$ e $\sigma_{c+} = 0.101$, respetivamente, definindo

$\theta_{l\pm} = 1$ na equação 6.12 e resolvendo em ordem a σ . Entre σ_{c-} e σ_{c+} , a velocidade de crescimento para aumento de σ é nula.

Como no caso do paracetamol, usou-se a equação 6.12 para ajustar os resultados de crescimento dos cristais de sulfato de potássio em estado não estacionário. Dado os valores indiferenciados de G_{\pm} e G_0 a $\sigma_0 = 0.168$, estima-se que o valor correspondente de θ_0 seja baixo tanto para diminuição como para aumento de σ . Os valores ajustados de $k_R = 18$ e $(\varepsilon/k_B T)^2 = 0.45$ foram obtidos usando uma estimativa de $\theta_0 = 0.05$. Novamente, calculou-se o valor de tensão interfacial γ a $T = 303\text{ K}$ a partir da definição $\varepsilon = \sqrt{\pi} \gamma d_m^2$ e usando $d_m = 4.78 \times 10^{-10}\text{ m}$. Neste caso, o valor estimado de $\gamma = 6.9\text{ mN/m}$ estava muito próximo do resultado de $\gamma = 6.3\text{ mN/m}$ obtido a partir de ensaios de nucleação de sulfato de potássio (Kashchiev et al., 2010). Como mostra a linha a vermelho na Figura 6.7, e como esperado para $\phi > 0$, a etapa de diminuição de σ produziu um efeito de envenenamento que culmina na cessação de crescimento a um valor estimado de σ_{c-} igual a 0.059. A etapa de aumento de σ que se segue, produziu um aumento drástico de G uma vez que foi ultrapassada a sobressaturação crítica $\sigma_{c+} = 0.101$. A linha azul na Figura 6.7 mostra como o modelo de CAMKOD é capaz de prever este novo exemplo de CCG caracterizado por uma restauração rápida da velocidade de crescimento de $G = 0$ a $G \cong G_0$. Também descrita como "renascimento do cristal" (Land et al., 1999; Ristic et al., 2008), este comportamento foi considerado difícil de explicar por um modelo matemático dada a série de eventos catastróficos envolvidos (Guzman & Kubota, 2005; Kubota et al., 2003). No caso particular das impurezas que adotando diferentes conformações em solução, a adsorção superficial multiestado foi proposta para explicar as cinéticas não-lineares observadas durante a biomineralização de oxalato de cálcio monoidratado na presença de péptidos ricos em aspartato (Friddle et al., 2010). É assim notável que um modelo genérico, como o modelo CAMKOD, seja capaz de descrever as curvas de G medidas quando σ diminui e aumenta de forma alternada ou consecutiva (Figura 6.7), na presença/ausência de crescimento catastrófico. Adicionalmente, o modelo CAMKOD pode ser aplicado a sistemas distintos, como cristais de paracetamol e sulfato de potássio. Além de serem fortemente não-lineares, as cinéticas medidas envolveram diferentes valores críticos de sobressaturação que também foram previstos pelo modelo matemático. Estas previsões foram possíveis usando apenas um par de parâmetros ajustados k_R e $(\varepsilon/k_B T)^2$ para cada sistema de cristalização soluto/impureza. Estes resultados juntamente com os

obtidos para HEWL (Figura 6.4 e Figura 6.5), não apenas confirmam que o modelo CAMKOD descreve adequadamente a dinâmica de ocupação de *kinks* por impurezas como também consolidam o modelo CAM como um mecanismo adequado para descrever o efeito de impurezas durante o crescimento cristalino.

6.4 Conclusões

Nos eventos de crescimento cristalino raramente são observadas condições de sobressaturação constante. Isto deve-se a diversos fatores, nomeadamente, a diminuição da concentração de soluto com o tempo, a evaporação de solvente e a variação da temperatura e do teor de impurezas. No trabalho abordado no Capítulo 5, a velocidade de variação de sobressaturação R_σ foi identificada como uma variável inexplorada que pode ser usada para promover ou inibir notoriamente o crescimento cristalino. A análise racional por detrás destes efeitos está descrita no desenvolvimento do modelo de adsorção competitiva (CAM), denominada CAM incluindo a ocupação dinâmica de *kinks* (CAMKOD). A ocupação de sítios ativos para crescimento (ou *kinks*) por impurezas determina a magnitude da inibição do crescimento e é o resultado das velocidades de (i) ligação de impurezas em locais ativos e (ii) formação/extinção de *kinks*. O atraso de um processo relativamente a outro pode ser induzido pela mudança rápida da sobressaturação com o tempo, conduzindo a valores de ocupação de *kinks* por impurezas em estado não estacionário, maiores (efeito de envenenamento) ou menores (efeito de purificação) dos que os verificados em equilíbrio. Os efeitos de envenenamento podem ser induzidos por aumento ou diminuição dos níveis de sobressaturação dependendo do valor do parâmetro ϕ , que na equação 6.6 é definido em função da cinética de formação de *kinks* e das constantes da adsorção superficial. Quando a barreira energética de formação de *kinks* é baixa, a densidade de *kinks* varia pouco com a sobressaturação e o parâmetro ϕ assume valores negativos. Nestes casos, a histerese em velocidade de crescimento (GRH) deriva de efeitos de purificação e de envenenamento causados, respetivamente, pelo aumento e diminuição da sobressaturação. Tal como os resultados de Figura 6.5 revelam, este tipo de GRH é observado em crescimento cristalino de HEWL na presença de dímeros da proteína. Quando a densidade de *kinks* varia notoriamente com a sobressaturação, $\phi > 0$, as

velocidades de crescimento são aceleradas para $R_\sigma > 0$ e retardado para $R_\sigma < 0$. Selecionaram-se na literatura exemplos de cristais de paracetamol (Shekunov et al., 1997) e de sulfato de potássio (Guzman et al., 2001) que crescem na presença de quantidades vestigiais de impurezas ativas e que manifestam este tipo de GRH. Embora estes dois casos envolvam diferentes procedimentos experimentais, ambos exibem crescimento cristalino catastrófico (CCG) caracterizado por uma rápida mudança de velocidades de crescimento provocada por variações suaves de sobressaturação. É digno de nota que o modelo CAMKOD permita descrever comportamentos tão distintos de GRH e CCG, recorrendo apenas ao ajuste de dois parâmetros, quando a maioria destes comportamentos são considerados difíceis de explicar na literatura recente (Guzman & Kubota, 2005; Kubota et al., 2003). De um modo geral, este trabalho evidencia como o modelo CAM pode ser efetivamente usado para entender e controlar os efeitos das impurezas durante o crescimento cristalino.

6.5 Referências bibliográficas

- Burton, W. K., Cabrera, N., & Frank, F. C. (1951). The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A*, 243, 299–358.
- Cabrera, N., & Vermilyea, D. A. (1958). *In Growth and perfection of crystals*. (R. H. Doremus, B. W. Roberts, & D. Turnbull, Eds.) Wiley. New York.
- Chernov, A. A., Rashkovich, L. N., & Vekilov, P. G. (2005). Steps in solution growth: dynamics of kinks, bunching and turbulence. *Journal of Crystal Growth*, 275, 1–18.
- De Yoreo, J. J., Zepeda-Ruiz, L. A., Friddle, R. W., Qiu, S. R., Wasylenki, L. E., Chernov, A. A., ... Dove, P. M. (2009). Rethinking Classical Crystal Growth Models through Molecular Scale Insights: Consequences of Kink-Limited Kinetics. *Crystal Growth & Design*, 9(12), 5135–5144.
- Friddle, R. W., Weaver, M. L., Qiu, S. R., Wierzbicki, A., Casey, W. H., & De Yoreo, J. J. (2010). Subnanometer atomic force microscopy of peptide-mineral interactions links clustering and competition to acceleration and catastrophe.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(1), 11–15.

Georgiou, D. K., & Vekilov, P. G. (2006). A fast response mechanism for insulin storage in crystals may involve kink generation by association of 2D clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1681–1686.

Guzman, L. A., & Kubota, N. (2005). Growth rate hysteresis of a potassium dihydrogen phosphate (KDP) crystal in the presence of traces of impurity. *Journal of Crystal Growth*, 275(1–2), e237–e242.

Guzman, L. A., Kubota, N., Yokota, M., Sato, A., & Ando, K. (2001). Growth Hysteresis of a Potassium Sulfate Crystal in the Presence of Chromium (III) Impurity 2001. *Crystal Growth & Design*, 1(3), 225–229.

Hendriksen, B. a., & Grant, D. J. W. (1995). The effect of structurally related substances on the nucleation kinetics of paracetamol (acetaminophen). *Journal of Crystal Growth*, 156(3), 252–260.

Heng, J. Y. Y., Bismarck, A., Lee, A. F., Wilson, K., & Williams, D. R. (2006). Anisotropic Surface Energetics and Wettability of Macroscopic Form I Paracetamol Crystals, (21), 2760–2769.

Kashchiev, D., Borissova, A., Hammond, R. B., & Roberts, K. J. (2010). Effect of cooling rate on the critical undercooling for crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 312(5), 698–704.

Kubota, N. (2001). Effect of Impurities on the Growth Kinetics of Crystals. *Cryst. Res. Technol.*, (36), 749–769.

Kubota, N., Yojota, M., Doki, N., Guzman, L. A., Sasaki, S., & Mullin, W. J. (2003). A Mathematical Model for Crystal Growth Rate Hysteresis Induced by Impurity. *Crystal Growth & Design*, 3(3), 397–402.

Land, T. A., Martin, T. L., & Potapenko, S. (1999). Recovery of surfaces from impurity poisoning during crystal growth. *Nature*, 399, 442–445.

Libbrecht, K. G. (2008). Observations of an Impurity-driven Hysteresis Behavior in Ice Crystal Growth at Low Pressure. *arXiv*, (809), 4863.

- Lovette, M. a., & Doherty, M. F. (2012). Predictive Modeling of Supersaturation-Dependent Crystal Shapes. *Crystal Growth & Design*, 12(2), 656–669.
- Lovette, M. A., & Doherty, M. F. (2012). Multisite models to determine the distribution of kink sites adjacent to low-energy edges. *Physical Review E*, 85(2), 21604.
- Martins, P. M., Ferreira, A., Polanco, S., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2009). Unsteady-state transfer of impurities during crystal growth of sucrose in sugarcane solutions. *Journal of Crystal Growth*, 311(15), 3841–3848.
- Martins, P. M., & Rocha, F. (2007). Characterization of crystal growth using a spiral nucleation model. *Surface Science*, 601(16), 3400–3408.
- Martins, P. M., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2011). Unsteady-state inhibition of crystal growth caused by solution impurities. *CrystEngComm*, 13, 1103–1110.
- Martins, P., Rocha, F. A., & Rein, P. (2006). The influence of impurities on the crystal growth kinetics according to a competitive adsorption model. *Crystal Growth & Design*, 6(12), 2814–2821.
- Ohara, M., & Reid, R. C. (1973). *Modelling Crystal Growth Rates from solution*. New Jersey: Prentice- Hall.
- Petrova, E. V., Shustin, O. a., & Vorontsova, M. a. (2009). The formation of a dislocation spiral on the (101) face of a monoclinic lysozyme crystal: High-resolution experiments. *Moscow University Physics Bulletin*, 64(3), 306–314.
- Pina, C. M., Merkel, C., & Jordan, G. (2009). On the Bimodal Effects of Silicic Acids on Calcite Growth. *Crystal Growth & Design*, 9(9), 4084–4090.
- Prasad, K. V. ., Ristic, R. I., Sheen, D. B., & Sherwood, J. N. (2001). Crystallization of paracetamol from solution in the presence and absence of impurity. *International Journal of Pharmaceutics*, 215(1–2), 29–44.
- Punin, Y. O., & Artamonova, O. I. (1989). Growth rate hysteresis of KH_2PO_4 crystals. *Kristallografiya*, 34, 1262–1266.
- Rashkovich, L. N., De Yoreo, J. J., Orme, C. a., & Chernov, a. a. (2006). In situ atomic force microscopy of layer-by-layer crystal growth and key growth concepts.

Crystallography Reports, 51(6), 1063–1074.

- Ristic, R. I., De Yoreo, J. J., & Chun, M. C. (2008). Does Impurity-Induced Step-Bunching Invalidate Key Assumptions of the Cabrera - Vermilyea Model ? *Crystal Growth & Design*, 8(4), 1119–1122.
- Saldi, G. D., Jordan, G., Schott, J., & Oelkers, E. H. (2009). Magnesite growth rates as a function of temperature and saturation state. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(19), 5646–5657.
- Sánchez-Pastor, N., Pina, C. M., Fernández-Díaz, L., & Astilleros, J. M. (2006). The effect of on the growth of barite {001} and {210} surfaces: An AFM study. *Surface Science*, 600(6), 1369–1381.
- Shekunov, B. Y., Grant, D. J. W., Latham, R. J., & Sherwood, J. N. (1997). In Situ Optical Interferometric Studies of the Growth and Dissolution Behavior of Paracetamol (Acetaminophen) Crystals . 3 . Influence of Growth in the Presence of. *Journal of Physical Chemistry B*, 5647(97), 9107–9112.
- Vekilov, P. G. (2007). What Determines the Rate of Growth of Crystals from Solution? *Crystal Growth & Design*, 7(12), 2796–2810.
- Vorontsov, D. a., Ershov, V. P., Portnov, V. N., Rodchenkov, V. I., & Sibirkin, a. a. (2011). Growth kinetics of KH₂PO₄ crystals in relation to solution macrocomposition. *Journal of Crystal Growth*, 318(1), 122–124.
- Vorontsov, D. A., Kim, E. L., Portnov, V. N., & Chuprunov, E. V. (2003). Growth of Filamentary KDP Crystals from Solution with the Addition of Al (NO₃)₃ · 9H₂ O. *Crystal Growth*, 48(2), 372–375.
- Worlitschek, J., & Mazzotti, M. (2004). Model-Based Optimization of Particle Size Distribution in Batch-Cooling Crystallization of Paracetamol. *Crystal Growth & Design*, 4(5), 891–903.

Parte III.

Nucleação

7 Nucleação

Conteúdo do Capítulo

O efeito da composição oligomérica no mecanismo de nucleação de cristais de HEWL foi investigado com recurso à técnica de DLS. Os resultados revelaram que a nucleação foi sempre antecederida pela formação de aglomerados metastáveis que, aparentemente, atuam como promotores/inibidores da nucleação. As cinéticas de nucleação em estado não estacionário foram interpretadas com base nos diferentes tipos de agregação.

7.1 Introdução

A produção de cristais de proteína com boas propriedades de difração para análise por cristalografia em raio-X tem sido fundamental para os avanços científicos na área da Biologia Estrutural. As moléculas de proteína são caracterizadas por um diagrama energético complexo que envolve diferentes estados conformacionais para além da conformação nativa de menor entropia (Tyka et al., 2011). Adicionalmente, as ligações não covalentes entre macromoléculas dão origem a oligómeros com diferentes dimensões, cujas concentrações dependem fortemente da temperatura, força iónica, pH e concentração total da amostra (Wilson et al., 1996). Além disso, os parâmetros da solução podem promover a formação de agregados maiores tais como, aglomerados metastáveis (Tanaka et al., 1999) e fibras de amilóide (Crespo et al., 2016). Estes aspetos, apenas associados à cristalização de macromoléculas, traduzem a complexidade do processo, impossível de descrever apenas pelas teorias convencionais de cristalização de moléculas pequenas (García-Ruiz, 2003). Por último, o passo da nucleação, comum à formação de qualquer cristal, é um dos processos menos entendidos da natureza (Vekilov, 2016), sendo que processos como a separação líquido-líquido (Wallace et al., 2013) e a precipitação amorfa (Veesler et al., 2003) poderão ainda ocorrer tal como no caso das moléculas mais pequenas.

O conhecimento das fases críticas de pré nucleação é, na sua maioria, obtido recorrendo à técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), que pode ser aplicada diretamente na solução de proteína sobressaturada sem provocar desnaturação ou outras interferências (Wilson, 2003). A lisozima da clara de ovo (HEWL) é a proteína de eleição nestes estudos, por ser acessível, bem caracterizada em termos de diagrama de fases (Muschol & Rosenberger, 1997), cinéticas de nucleação de cristais (Akella et al., 2014) e cinéticas de crescimento cristalino (Liu et al., 2010). O perfil de DLS das soluções em condições de pré nucleação é comum a outras proteínas (Schubert et al., 2015; Vekilov, 2016) e revelam a presença de dois grupos de partículas; um que consiste em monómeros de proteína e oligómeros de pequena ordem, e outro composto por aglomerados de proteína, contendo mais de 10^5 moléculas agregadas (Georgalis et al., 1995; Niimura et al., 1999; Onuma & Kanzaki, 2007; Pan et al., 2010; Saridakis et al., 2002).

À luz da Lei de *Rayleigh* da dispersão da luz (Pan et al., 2007), o raio hidrodinâmico médio do último grupo é $50\times$ maior que o primeiro ($R_2 > 50R_1$) e R_1 está na ordem de grandeza da dimensão molecular. Existe, no entanto, várias questões sobre a composição e natureza destas duas populações que carecem de esclarecimento. Recentemente, a técnica de dispersão de raio-X de baixos ângulos (SAXS) foi usada para determinar a composição oligomérica de HEWL e testar um modelo estrutural dominado por monómeros, dímeros e octâmeros em condições de cristalização, ou apenas monómeros na impossibilidade de crescimento cristalino (Kovalchuk et al., 2016). Estas medições indicaram que o octâmero é a unidade de crescimento cristalino mais provável (Kovalchuk et al., 2016), em conformidade com as estimativas anteriores provenientes de velocidades de crescimento de cristais de lisozima tetragonais modeladas por Li et al. (1995). O modelo de crescimento cristalino desenvolvido por Li e outros colaboradores inclui um percurso de oligomerização do tipo monómero \leftrightarrow dímero \leftrightarrow tetrâmero \leftrightarrow octâmero \leftrightarrow 16-mero que foi confirmado posteriormente por medições de dados de fluxo de diálise (Wilson et al., 1996).

Em relação aos agregados de elevada ordem, deve ser feita uma distinção entre aglomerados metastáveis, formados a níveis de sobressaturação moderadas (Georgalis et al., 1995; Tanaka et al., 1999), e gotas de fase densa, formadas depois da separação líquido-líquido a elevadas concentrações de proteína (frequentemente >100 mg/mL)

(Muschol & Rosenberger, 1997; Pan et al., 2010; Vekilov & Vorontsova, 2014). Ambas as espécies apresentam valores iniciais do raio hidrodinâmico semelhantes, mas ao passo que os aglomerados metastáveis são formados depois de uma *lag phase* de duração variável (Tanaka et al., 1999) e seguidamente crescem de forma contínua com o tempo (Georgalis et al., 1995), as gotas de fase densa aparecem imediatamente depois da preparação da solução e os raios médios mantêm-se inalterados após várias horas de monitorização (Pan et al., 2010; Vekilov & Vorontsova, 2014). A partir da variação do raio hidrodinâmico R_2 com o tempo segundo uma lei de potência, tentou-se classificar o crescimento de aglomerados como sendo um mecanismo limitado pelos passos de difusão ou de reação, dependendo dos valores da potência de base t (Georgalis et al., 1995; Tanaka et al., 1999). O inverso deste expoente corresponde à dimensão fractal d_f , cujos valores para cristalização em soluções de HEWL foram estimados na gama de 1.7 a 2 (Georgalis et al., 1995; Parmar et al., 2007; Tanaka et al., 1999). Embora este fato possa sugerir que os aglomerados se agregam na forma de estruturas fractais, valores similares de d_f foram obtidos na evolução do tamanho de aglomerados pré agrupados presentes em HEWL liofilizada, usada em estudos de nucleação (Parmar et al., 2007). Após a remoção prévia dos agregados contaminantes, são necessários períodos de tempo mais longos de forma a produzir menos cristais e de maiores dimensões. Este acontecimento evidencia o papel dos aglomerados como centros de nucleação heterogénea (Parmar et al., 2007). De forma análoga, os cristais maiores e com melhor morfologia poderiam ser produzidos por diluição de gotas de cristalização em condições de nucleação para condições metastáveis após a formação dos aglomerados mesoscópicos (Saridakis et al., 2002). Este procedimento causou a reversão parcial de agregados de elevada ordem em proteína solúvel (Saridakis et al., 2002), o que, por sua vez, diminuiu a quantidade de centros de nucleação heterogénea e levou à produção de cristais maiores.

Ao contrário dos aglomerados metastáveis, as gotas de fase densa (rica em proteína) são um estado intermédio do processo de cristalização onde irá ocorrer a nucleação de cristais (Vekilov & Vorontsova, 2014; Vorontsova et al., 2015). Em comparação com as condições comumente adotadas em Biologia Estrutural, a separação líquido-líquido requiere níveis de sobressaturação muito elevados, correspondentes a altas concentrações de lisozima e precipitante e a baixas temperaturas (Pan et al., 2010). As cinéticas de nucleação de HEWL na fase líquido-líquido afastam-se das previsões da

teoria clássica da nucleação (Galkin & Vekilov, 1999), enquanto que estas diferenças tornam-se menos evidentes a níveis de sobressaturação ligeiramente inferiores (Akella et al., 2014; Liu et al., 2010). Neste capítulo, foram estudadas regiões situadas mais abaixo do diagrama de fases, cujos resultados de cristalização são erráticos, isto é, a formação de cristais de proteína pode ocorrer ou não.

A experiência em cristalografia macromolecular revela que ensaios realizados em condições operatórias idênticas podem originar resultados muito diferentes qualquer que seja a proteína em estudo (Gorrec, 2013; Luft et al., 2014; Luft et al., 2011; Newman et al., 2007). Alguns replicados poderão apresentar cristais ao fim de algumas horas enquanto que outros não produzem cristais após vários dias de observação. Contudo, esta variabilidade não deve ser atribuída apenas à natureza estocástica da nucleação (Martins & Rocha, 2008; Newman et al., 2007). Recorrendo a microscopia ótica, foram realizadas medições de velocidades de nucleação de cristais de HEWL que apontam para a existência de percursos de agregação concorrentes à nucleação do cristal.

A análise por DLS confirma o decréscimo de proteína monomérica em solução, causado pela formação sequencial de pequenos oligómeros e aglomerados metastáveis que ultrapassam as dimensões submicrométricas. Os agregados provenientes deste percurso *off-pathway* podem ter um efeito positivo na cristalização pois o crescimento cristalino parece ser favorecido pelas espécies oligoméricas, enquanto que os aglomerados mesoscópicos são confirmados como centros de nucleação heterogénea.

7.2 Método experimental

Preparação da amostra

A lisozima liofilizada proveniente da clara de ovo (adquirida à *Merk*) foi dissolvida em 0.2 M de solução tampão de acetato de sódio, a pH 4.7, contendo a 3% (w/v) de cloreto de sódio. As soluções foram preparadas a 28 °C, com concentrações finais de HEWL de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/mL e filtradas em filtros esterilizados com 0.22 µm de abertura de poro (*Millipore Millex-GV*).

Ensaio de nucleação

Os ensaios de nucleação decorreram na instalação experimental detalhada na secção 3.1. O tempo de indução aparente da nucleação de cristais foi determinado a partir da análise de imagens de diferentes gotas, captadas ao longo da experiência.

Foram colocadas gotas de 0.7 μL de solução sobressaturada de HEWL, com 3 % (w/v) de cloreto de sódio e 0.2 M de acetato de sódio a pH 4.7, por cima de um cilindro de vidro (*glass sitting drop rod*- HR3-146, Hampton Research) existente no interior da célula de crescimento encamisada, coberta com 1 mL de óleo de parafina para evitar a sua evaporação e suprimir a nucleação heterogénea na interface óleo/solução (Galkin e Vekilov, 1999). As experiências de nucleação foram realizadas a temperaturas constantes de 12.6, 14.0, 15.0, 16.0, 17.0, 18.0 e 20.0 °C. Se ao fim de 24 horas não fossem detetados cristais, a experiência era interrompida e atribuído ao tempo de indução um valor muito elevado, não quantificável. As velocidades de nucleação de cristal foram calculadas a partir do número de cristais formados por unidade de volume de gota e por unidade de tempo de indução aparente. Foram estudadas uma variedade de condições em replicado para avaliar o efeito da temperatura e da concentração de HEWL nos tempos de indução e nas velocidades de nucleação. Nas primeiras 24 horas de incubação, as gotas de 0.7 μL de solução em condições experimentais similares não apresentaram uma variação significativa da concentração de HEWL e de atividade enzimática (ver Capítulo 4).

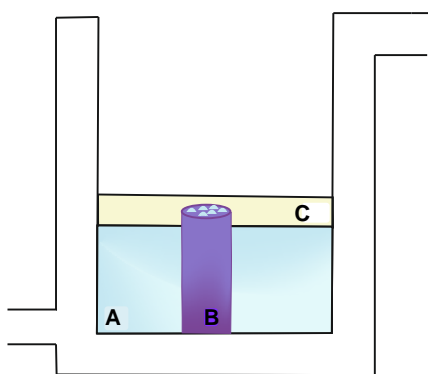


Figura 7.1: Representação esquemática da instalação experimental dos ensaios de nucleação constituída por: A) 2 mL de água, B) cilindro de vidro (*glass sitting drop rods*) no qual eram colocadas gotas de solução de HEWL e C) 1 mL de óleo de parafina.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Nucleação de cristais de HEWL acompanhada por microscopia ótica

Para estudar os percursos alternativos de agregação coexistentes com a nucleação de cristais de proteína, foram selecionadas condições de cristalização de HEWL para as quais a probabilidade de nucleação é menor que 1. Em particular, usou-se a microscopia ótica para acompanhar gotas de 0.7 μL de solução contendo 25 mg/mL a 50 mg/mL de HEWL, 3% (w/v) de NaCl em 0.2 M de solução tampão de acetato de sódio, a pH 4.7 e a temperaturas constantes entre 12.6 $^{\circ}\text{C}$ e 20.0 $^{\circ}\text{C}$. Como previsto, em replicados da mesma experiência, o tempo requerido para a observação do primeiro cristal (t_1) variou de alguns minutos para valores extremamente elevados, considerados indeterminados (Figura 7.2).

Na Figura 7.2A está representada em escala log-linear a influência de T nos valores medidos de t_1 (símbolos a cheio) para soluções a diferentes concentrações de HEWL (indicadas na barra lateral) e 3% (w/v) de NaCl. Os diâmetros dos símbolos sem preenchimento da Figura 7.2A são proporcionais ao número de gotas sem cristais durante o período de observação de pelo menos 1 dia. A Figura 7.2B apresenta graficamente em escala log-linear a média e os intervalos de confiança, de 90%, dos valores de t_1 obtidos para cada concentração de HEWL excluindo as gotas sem cristais.

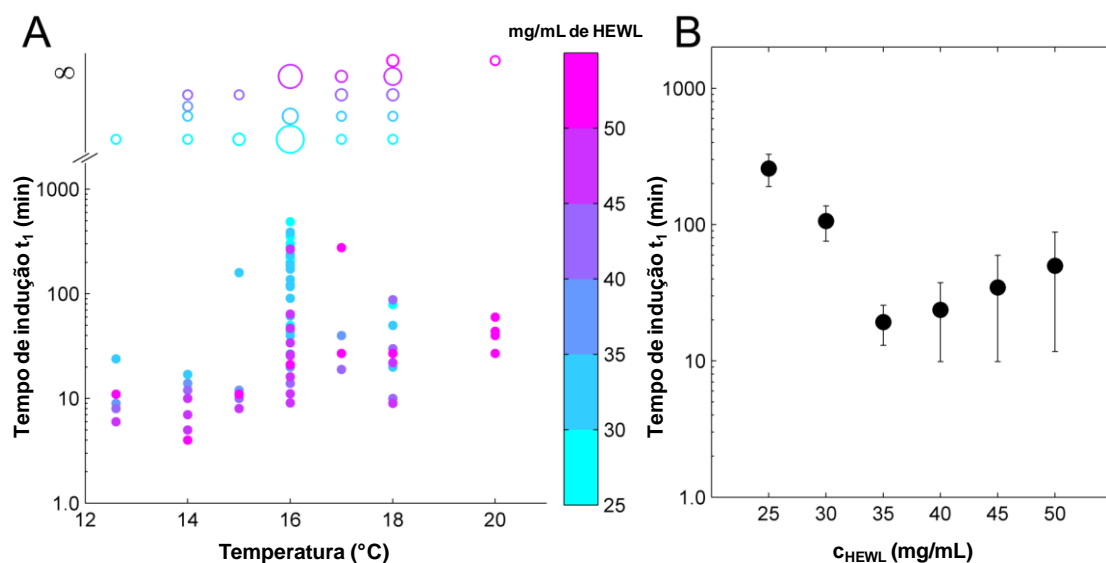


Figura 7.2: Influência da temperatura (T) e da concentração de HEWL (c_{HEWL}) no tempo de indução para nucleação cristalina (t_1).

A condição de estado estacionário aplicada às velocidades de nucleação implica um valor *finito* do valor destas velocidades aplicável a todos os replicados (Galkin & Vekilov, 1999, 2001; Ildefonso & Candoni, 2013). Tal não se verificou no caso das nossas experiências, uma vez que só uma fração das gotas observadas produziu cristais. Em vez disso, os dados na Figura 7.2A sugerem a existência de pelo menos dois regimes de nucleação consoante correspondam a valores de t_1 finitos ou indeterminados. Nesta secção, abordar-se-á os aspetos cinéticos do regime produtivo, e nas seções posteriores serão discutidos os casos de gotas sem cristais. O efeito da temperatura no tempo necessário para nucleação é demasiado ténue para ser perceptível nos resultados da Figura 7.2A. De facto, de acordo com medições sistemáticas de cinéticas de nucleação em condições experimentais comparáveis, a gama de temperaturas de 12.6 a 20.0 °C assinala a transição dos efeitos de T na velocidade de nucleação de positivos para negativos (Galkin & Vekilov, 2001). Na Figura 7.2B, os valores médios de t_1 estão representados em função da concentração de HEWL considerando um efeito marginal de T e excluindo os casos de não produção de cristais. À medida que a concentração de proteína aumenta, os valores de t_1 diminuem, inicialmente de > 4 horas para um mínimo de cerca de 20 minutos alcançado a $c_{HEWL} = 35$ mg/mL. Acima deste limite de concentração, os tempos de indução aumentam progressivamente até atingirem valores próximos de 1 hora para $c_{HEWL} = 50$ mg/mL. Esta tendência não era espectável, pois parte-se do princípio que os níveis de sobressaturação mais elevados impostos para $c_{HEWL} > 35$ mg/mL deveriam continuar a diminuir o tempo de indução até valores inferiores a alguns minutos. Embora t_1 seja um tempo de indução aparente - é necessário um período de crescimento cristalino (t_g) até que o primeiro núcleo assuma dimensões observáveis (García-Ruiz, 2003) - é esperado que a duração de t_g diminua com c_{HEWL} . Assim, os tempos de indução observados na Figura 7.2B não seguem a tendência esperada, mas antes apontam para um mecanismo de nucleação composto por um conjunto de eventos, alguns dos quais afetados desfavoravelmente por concentrações de proteína mais elevadas.

Tudo indica que os tempos de indução obtidos na Figura 7.2 não resultam de nucleação secundária (i.e., a formação de novos núcleos devido à presença de outros cristais em solução) uma vez que o número de cristais por gota foi pequeno (na maioria das vezes < 5 e sempre < 16) e a observação contínua das gotas mostrou que os cristais formam-se sensivelmente ao mesmo tempo. Também, o óleo de parafina usado para

evitar a evaporação de gota reduziu de forma notória o evento de nucleação heterogénea quando comparada com a formação extensiva de cristais de HEWL na interface cuvette/solução nos ensaios de DLS (ver abaixo).

A estimativa da média de velocidades de nucleação (representadas por símbolos com preenchimento na Figura 7.3) foi feita excluindo as gotas que não produziram cristais. Os valores de J foram calculados como números de cristais formados por unidade de volume de gota e por unidade de tempo de indução, para intervalos de confiança de 90 %. A inserção gráfica na Figura 7.3 ilustra um método alternativo para o cálculo de J (representadas por símbolos sem preenchimento) baseada na evolução média de cristais por gota ao longo do tempo, incluindo gotas com e sem cristais. Neste exemplo, foram estudadas 24 gotas diferentes de 30 mg/mL de solução de HEWL a 16.0 °C, e 12.5 % destas gotas não produziram cristais ao fim 24 horas. Dado que este método não separa os dois regimes de nucleação, a velocidade de nucleação limite dada pelo declive inicial da curva é muito mais baixo que o resultado obtido pelo primeiro método (~1 ordem de grandeza no exemplo considerado na Figura 7.3). A curva de progresso do tipo hiperbólica representada na inserção gráfica indica uma diminuição gradual nas velocidades de nucleação homogénea até à cessação completa assim que o tempo de incubação ultrapassa um valor limite t^* . Nas experiências realizadas a 16.0 °C, os valores de t^* diminuíram de ~8 horas para 4 horas quando c_{HEWL} aumentou de 25 mg/mL para 40 mg/mL.

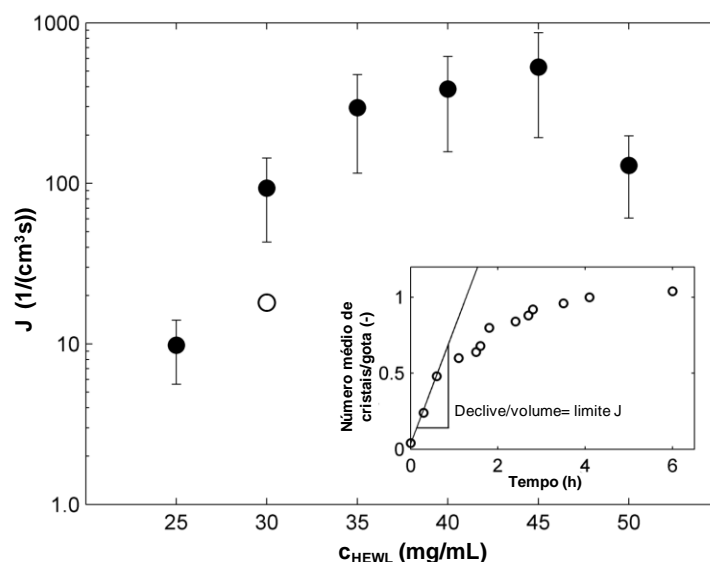


Figura 7.3: Representação em escala log-linear da influência da concentração de proteína na velocidade de nucleação de cristais (J).

Comparativamente com os tempos de indução na Figura 7.2B, os valores de J correspondentes a nucleação mais rápida são observados a concentração de HEWL superiores a 35 mg/mL. Isto reflete o aumento do número de núcleos formados para $c_{HEWL} > 35$ mg/mL. A influência de c_{HEWL} nas velocidades de nucleação é claramente distinta da relação do tipo exponencial, tradicionalmente associada a cinéticas de nucleação homogênea (Akella et al., 2014; Galkin & Vekilov, 1999, 2001). Em suma, as tendências não monotônicas expressas nas Figura 7.2B e Figura 7.3 convergem para um mecanismo de nucleação cristalino constituído por diversos passos, que pode ser afetado positiva ou negativamente pela concentração de proteína, dependendo de qual o passo limitante. A hipótese de valores maiores de c_{HEWL} promoverem percursos de agregação alternativos à formação de núcleos pré cristalinos será avaliada com base nos dados de DLS.

7.3.2 Resultados de DLS indicam diferentes percursos de agregação

Os ensaios de DLS não reproduzem exatamente as condições de cristalização em gota dada a diferença de volumes da amostra (1.0 mL *versus* 0.7 μ L) e as interfaces dominantes (cuvete de vidro *versus* óleo de parafina) em cada técnica. Tendo este aspeto em conta, usou-se a técnica de DLS para investigar se os resultados obtidos nas

Figuras 7.2 e 7.3 estavam relacionados com percursos alternativos de agregação em solução. À semelhança do que é reportado noutros trabalhos científicos (Parmar et al., 2007), os cristais de HEWL formam-se, na sua maioria, ao longo das paredes da cuvete de DLS, ficando alguns depositados na base da mesma. Uma vez que a população de cristais imobilizados não provoca interferências significativas na luz dispersa, foi possível medir os tempos de decaimento das principais espécies em solução durante as fases de pré- e pós-nucleação dos cristais de HEWL.

A Figura 7.4 apresenta a distribuição de tamanhos obtida a partir da análise das funções de correlação dos tempos de decaimento usando o algoritmo CONTIN (Provencher, 1982). Esta figura confirma a presença dos 2 grupos de pré nucleação esperados em condições de sobressaturação moderada: proteína solúvel com raio hidrodinâmico médio $R_1 \cong 3\text{nm}$ e aglomerados metastáveis com raio hidrodinâmico médio $R_2 > 100\text{ nm}$. A análise de DLS de soluções de proteína isentas de NaCl (linha a tracejado da Figura 7.4) mostra uma distribuição estreita de proteína solúvel com pico em $R_1 = 2.15\text{ nm}$, um valor concordante com o raio hidrodinâmico estimado para o monómero de lisozima (Georgalis et al., 1995; Tanaka et al., 1999). Estas amostras não revelaram sinais de agregação de proteína em incubação a $16.0\text{ }^\circ\text{C}$. Em contrapartida, a presença de precipitante não só diminuiu a solubilidade de proteína como também promoveu a formação rápida de oligómeros de pequena ordem responsáveis pelo aumento de valor de R_1 logo nos instantes iniciais de incubação. Por sua vez, o passo de oligomerização é seguido por formação de aglomerados metastáveis ao fim de menos de 6 minutos após a mistura das soluções de proteína e precipitante em condições de c_{HEWL} entre 25 mg/mL e 50 mg/mL , 3 \% (w/v) de NaCl, a $\text{pH } 4.7$ e $16.0\text{ }^\circ\text{C}$. Quando os ensaios decorrem a temperaturas mais elevadas (ver abaixo um exemplo a $25.0\text{ }^\circ\text{C}$), o tempo de indução precedendo a formação de aglomerados metastáveis é muito mais longo.

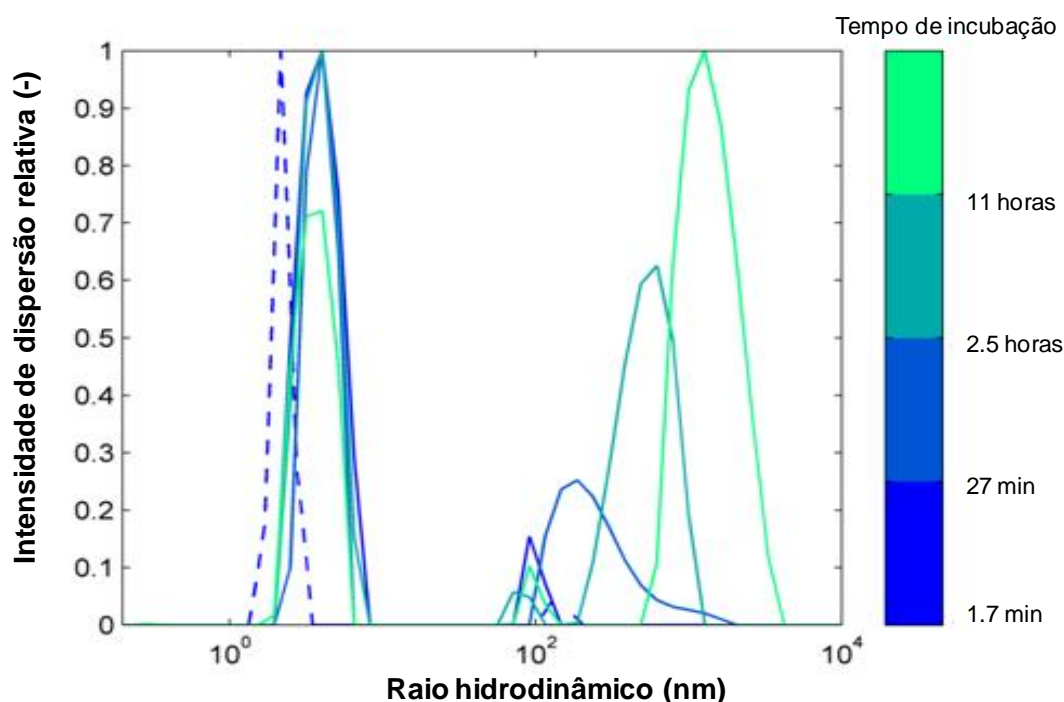


Figura 7.4: Dados de DLS obtidos para soluções de 40 mg/mL de HEWL contendo 3 % (w/v) de NaCl, a pH 4.7 e 16.0 °C (linhas a cheio) e de 50 mg/mL de HEWL isento de NaCl (linha a tracejado). As cores representam os diferentes tempos de incubação diferentes indicados na barra lateral.

A Figura 7.4 mostra um declínio progressivo da intensidade de dispersão relativa do pico R_1 em consequência da diminuição da concentração da proteína solúvel devido à formação e crescimento de aglomerados metastáveis, mas também devido à formação de cristais de HEWL visíveis nas paredes da cuvete ao fim de menos de 1 hora de ensaio. A hipótese de que os oligómeros e aglomerados metastáveis são promotores/inibidores da nucleação de cristais será abordada a seguir, com base numa análise em separado dos picos R_1 e R_2 .

7.3.3 Percurso de oligomerização

A Figura 7.5 aborda a influência de c_{HEWL} no tamanho e composição dos diferentes estados de oligomerização de proteína solúvel. Em todos os casos representados na Figura 7.5A, as distribuições de tamanhos estacionárias foram alcançadas muito rapidamente apesar de se verificar algumas flutuações nos primeiros

30 minutos. Constatase que o aumento da concentração total de proteína conduz ao aumento notório da intensidade de luz dispersa por oligómeros solúveis maiores que 3 nm. Embora as informações recolhidas da análise de DLS não sejam por si só suficientes para discriminar a população de diferentes n-meros presentes em solução, a combinação dos resultados da Figura 7.5A com o modelo de equilíbrio composto por monómeros \leftrightarrow dímeros \leftrightarrow tetrâmeros \leftrightarrow octâmeros \leftrightarrow 16-meros de HEWL (Li et al., 1995) permitiu estimar as diferentes composições oligoméricas para cada valor de c_{HEWL} . Com base na dimensão monomérica obtida na Figura 7.4 (2.15 nm), a lei de dispersão de luz de *Rayleigh* foi usada para estimar os tamanhos hidrodinâmicos de dímeros (2.71 nm), tetrâmeros (3.41 nm), octâmeros (4.30 nm) e 16-meros (5.42 nm), assumindo geometria esférica (linhas a tracejado da Figura 7.5A). A intensidade de dispersão correspondente a cada tamanho foi diretamente interpolada a partir das distribuições da Figura 7.5A e normalizada pela sexta potência de tamanho de n-mero. Depois, os valores de intensidade obtidos foram usados para estimar a fração de cada oligómero, que por sua vez foi multiplicado à concentração total de proteína para obter as composições absolutas representadas na Figura 7.5B. A inserção gráfica da Figura 7.5B apresenta em escala log-linear o efeito de c_{HEWL} em J (círculos com preenchimento) e na concentração de monómero em equilíbrio elevada à potência de 2 (c_{1-mero}^2) (círculos a aberto).

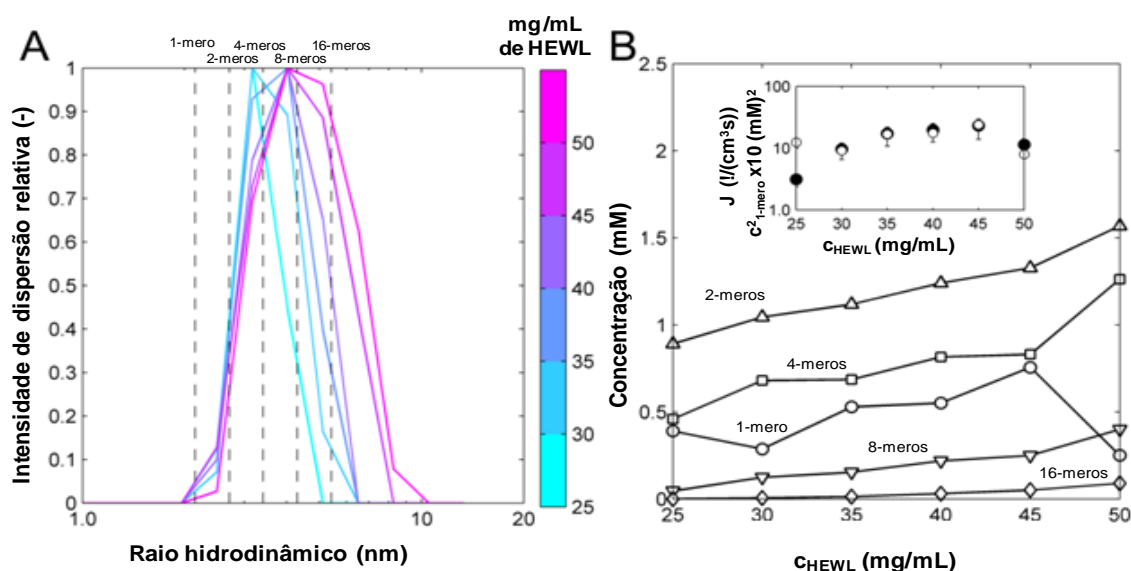


Figura 7.5: (A) Influência da concentração inicial de HEWL na distribuição de tamanhos de proteína solúvel. O conjunto de dados de DLS foi recolhido ao fim de <30

minutos de incubação a 16.0 °C de soluções de HEWL contendo 3 % (w/v) NaCl. (B) Composição oligomérica calculada a partir de dados de DLS representados em (A).

Para comparar os valores estimados com os resultantes de modelos já validados (Li et al., 1995; L. J. Wilson et al., 1996), as constantes de equilíbrio $K_{n \rightarrow 2n}$ de cada reação de oligomerização $n \rightarrow 2n$ foram calculadas usando os valores de concentração molar oligomérica (c_{n-mer}), conforme sugerido por Li e outros colaboradores (1995):

$$K_{n \rightarrow 2n} = (c_{2n-mer}^{1/2} / c_{n-mer})^{1/n} \quad (7.1)$$

onde n é um valor inteiro entre 1 e 8. A Tabela 7.1 sumariza os resultados obtidos neste trabalho e por Li e outros colaboradores (1995), em condições similares de cristalização de lisozima. Os valores médios medidos de $K_{n \rightarrow 2n}$ são comparados com os dados obtidos por Li e outros colaboradores (1995) para as concentrações de lisozima idênticas na presença de 3 % (w/v) de NaCl, pH 4.6. Os valores de literatura foram calculados a 16.0 °C usando constantes pré exponenciais e entalpias de reação obtidas por Li e outros colaboradores (1995), assumindo o octâmero como unidade de crescimento cristalino. A concordância entre as estimativas fornecidas por dois métodos tão distintos é notável, tendo sido o modelo de Li e colaboradores adicionalmente validado por análises de dados de fluxo de diálise (Wilson et al., 1996).

Tal como os valores de desvio-padrão (DP) mostram, diferentes concentrações de proteína provocaram pequenas variações no valor estimado das constantes de equilíbrio, exceptuando a constante de dimerização, cuja a dispersão de valores não demonstra uma dependência clara de c_{HEWL} . O valor de $K_{8 \rightarrow 16} = 0$ obtido a 25 mg/mL de HEWL deve-se provavelmente a uma concentração de 16-meros insuficiente à detecção de sinal produzido por DLS.

A influência de c_{HEWL} nos tempos de indução e nas velocidades de nucleação cristalina (Figura 7.2B e Figura 7.3) pode agora ser interpretada à luz das composições oligoméricas representadas na Figura 7.5B, onde a concentração de monómeros é elevada à potência de 2, sob a suposição de um mecanismo de nucleação bimolecular. Apesar de ser possível a formação de núcleos pré cristalinos a partir de outras espécies oligoméricas, as variações equivalentes de J e c_{1-mero}^2 com c_{HEWL} sugerem claramente

um percurso de cristalização preferencial que se inicia nos monómeros. As recentes medições de SAXS das composições oligoméricas de HEWL em condições de cristalização identificaram quantidades pouco significativas de tetrâmeros em solução (Kovalchuk et al., 2016). A análise dos resultados de DLS na Figura 7.5A com base num modelo de equilíbrio sem tetrâmeros não altera as principais conclusões tiradas até aqui.

Tabela 7.1: Constantes de equilíbrio calculadas da equação 7.1 para diferentes concentrações de HEWL.

	c_{HEWL} (mg/ml)						Média	\pm	DP	Li et al. (1995)
	25	30	35	40	45	50				
$K_{1 \rightarrow 2} (M^{-1/2})$	76.5	112.5	63.3	63.9	48.2	158.2	72.9	\pm	41.1	30.3
$K_{2 \rightarrow 4} (M^{-1/4})$	4.90	5.00	4.84	4.80	4.66	4.76	4.83	\pm	0.12	5.20
$K_{4 \rightarrow 8} (M^{-1/8})$	1.96	2.01	2.06	2.06	2.09	1.99	2.03	\pm	0.05	2.50
$K_{8 \rightarrow 16} (M^{-1/16})$	0.00*	1.45	1.49	1.50	1.52	1.49	1.49	\pm	0.03	1.83

* Valor não incluído no cálculo da média.

7.3.4 O percurso de formação de aglomerados metastáveis

A influência ambígua de concentração de proteína nos tempos de indução e velocidades de nucleação apresentada nas Figura 7.2B e Figura 7.3 está em conformidade com a variação de concentração de monómeros expressa na Figura 7.5B. Contudo, duas questões permanecem sem resposta: será que a agregação de proteínas na forma de aglomerados metastáveis teve algum contributo para as cinéticas de nucleação observadas? E por que razão ensaios nas mesmas condições de cristalização apresentam resultados tão diferentes? Relativamente à primeira questão, constata-se que a gama de concentrações entre 25 e 50 mg/mL de HEWL não teve um impacto evidente na dimensão inicial de aglomerados mesoscópicos ($R_2(0) \cong 100$ nm) ou na velocidade de crescimento de aglomerados (dimensão fractal, $d_f \cong 2.0$), durante a fase de pré cristalização (primeiros 30 minutos). Logo, tudo indica que as curvas de velocidade de nucleação atípicas não estão relacionadas com a formação de aglomerados. No entanto, o percurso de formação de aglomerados pode esclarecer as velocidades de nucleação em estado não estacionário, caracterizadas por diminuição de valores de J com o tempo (inserção gráfica na Figura 7.3).

A Figura 7.6A representa o raio hidrodinâmico médio de aglomerados metastáveis (R_2) em função do tempo numa escala log-log. A linha sólida da Figura 7.6A apresenta o ajuste não linear de mínimos quadrados da expressão da lei de potência $R_2 = R_2(0) \times (1 + constante \times t)^{1/d_f}$ aos dados de crescimento de aglomerados medidos durante a fase de pré cristalização (Georgalis et al., 1995). A linha a tracejado da Figura 7.6A mostra a extrapolação de curva ajustada às fases de agregação posteriores. Conforme evidenciado na inserção gráfica da Figura 7.6A, o valor da dimensão fractal corresponde ao inverso do declive ($d_f = 1.93$). As Figura 7.6 B e C são as representações gráficas em escala linear-log da % da intensidade de luz dispersa pela proteína solúvel e da intensidade total de luz dispersa em função do tempo, respetivamente.

Como ilustrado na Figura 7.6A, o crescimento dos aglomerados antecede a formação de cristais de HEWL e prossegue em paralelo com o crescimento cristalino. Por conseguinte, a redução progressiva de proteína solúvel é a consequência de dois percursos concorrentes que produzem, num caso, aglomerados metastáveis e, no outro,

cristais de proteína. Supõe-se que o estado não estacionário da nucleação de cristais resulte da diminuição gradual da concentração de proteína solúvel causada pelo percurso alternativo à cristalização. Neste sentido, a natureza estocástica é amplificada de modo que tempos de indução longos se tornam ainda mais longos devido à perda contínua de moléculas de proteína solúvel. Após um dado período de tempo isento de núcleos cristalinos, a concentração de proteína solúvel pode atingir o limite mínimo, abaixo do qual não é possível a nucleação de cristais. Desta forma, regimes produtivos e não produtivos resultam de um mecanismo molecular comum envolvendo percursos de agregação promotores (*on-pathway*) e não promotores (*off-pathway*) da cristalização; assim, a dispersão de resultados experimentais deve-se à natureza estocástica de nucleação que é amplificada pela contínua diminuição de proteína solúvel durante o crescimento de aglomerados.

As variações de peso relativo do pico R_1 (Figura 7.6B) e da intensidade de dispersão total (Figura 7.6C) refletem principalmente o crescimento de aglomerados metastáveis. A diminuição da concentração de proteína solúvel resultante do crescimento de aglomerados e de cristais deveria, em princípio diminuir a intensidade de dispersão total. Este efeito é, na sua maior parte, camuflado na Figura 7.6C pela influência predominante do crescimento dos aglomerados metastáveis. Ao fim de cerca de 5 horas, estes aglomerados excedem o tamanho sub-micrométrico (Figura 7.6A) e tendem a sedimentar tal como indicado pela diminuição concomitante da intensidade total de dispersão de luz na Figura 7.6C. Uma vez que o peso relativo do pico R_1 e a intensidade total de dispersão de luz diminuem simultaneamente durante este período, conclui-se que os cristais formados continuam a crescer após 5 horas de incubação (confirmado por imagens captadas ao longo do ensaio).

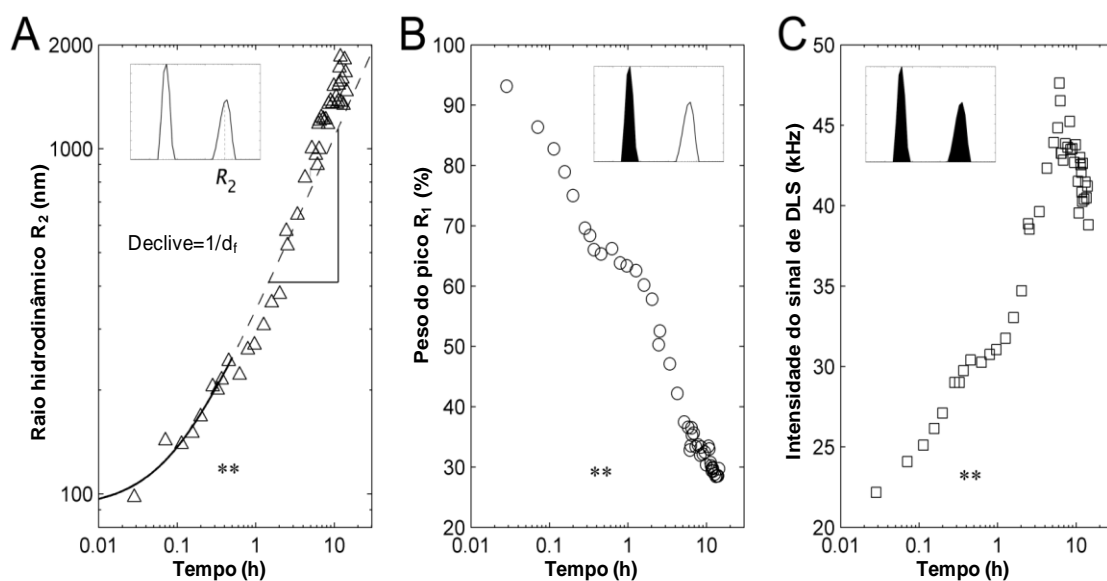


Figura 7.6: Crescimento de aglomerados metastáveis em condições de cristalização de 40 mg/mL de HEWL, 3 % (w/v) de NaCl a pH 4.7 e 16.0 °C (sobressaturação ~ 8.9). Os asteriscos (**) indicam o tempo estimado da formação dos primeiros cristais.

Apesar da formação generalizada de aglomerados *off-pathway* verificada nos ensaios de DLS, foram sempre observados muitos cristais nas paredes do vidro da cuvete poucas horas após a preparação das soluções. Este facto enfatiza o papel das interfaces durante a cristalização de proteínas (Ildefonso & Candoni, 2013; Silver et al., 2011), pois a cristalização em gotas de 0.7 μL em condições equivalentes apresentaram taxas de sucesso muito mais baixas (Figura 7.2A). Por outro lado, os aglomerados metastáveis não parecem ser apenas competidores da cristalização pois a sua presença antecede sempre a formação de cristais de HEWL. As análises por DLS de soluções de cristalização com probabilidade menores de nucleação explicam melhor este aspeto: os resultados da Figura 7.7 foram obtidos reduzindo o nível de sobressaturação em relação aos ensaios anteriores através do aumento da temperatura de incubação para 25.0 °C. Como primeira consequência, o tamanho médio inicial de proteína solúvel medida para 50 mg/mL de HEWL diminuiu de $R_1 \cong 4.5$ nm a 16.0 °C para $R_1 \cong 3.0$ nm a 25.0 °C. Também em contraste com o comportamento observado a 16.0 °C, na Figura 7.7A constata-se um aumento progressivo de R_1 com o tempo até atingir um patamar de cerca de 3.4 nm ao fim da primeira hora e, em seguida, aumenta ligeiramente até 3.5 nm em simultâneo com a formação dos primeiros aglomerados metastáveis cerca de 4.5 horas após o início da experiência. Os valores crescentes de R_1 sugerem a formação gradual de oligómeros solúveis tais como tetrâmeros, octâmeros ou 16-meros, que são, ao que

tudo indica, necessários para a produção de aglomerados metastáveis, como evidenciado pelo subsequente retorno de R_1 para valores abaixo de 3.4 nm. O período de tempo de cerca de 4 horas que sucede ao aparecimento de aglomerados é caracterizado por uma diminuição gradual de sensivelmente 5% do peso relativo da intensidade do primeiro pico (Figura 7.7B) e por valores aproximadamente constantes de intensidade de dispersão total (Figura 7.7C). Isto contrasta com os resultados anteriormente apresentados nas Figura 7.6B e Figura 7.6C e evidencia uma formação de aglomerados menos extensa a 25.0 °C. Uma vez que a % do pico R_1 diminuiu continuamente sem variação significativa no total de luz dispersa, confirma-se que os aglomerados metastáveis crescem pela integração de proteína solúvel e não pela auto-agregação de pequenos aglomerados. Este tipo de mecanismo era difícil de discernir com base nos dados das Figura 7.6B e Figura 7.6C, pois por causa da influência predominante do crescimento de aglomerados na intensidade de dispersão total, o método torna-se menos sensível a variações no número de monómeros e pequenos oligómeros.

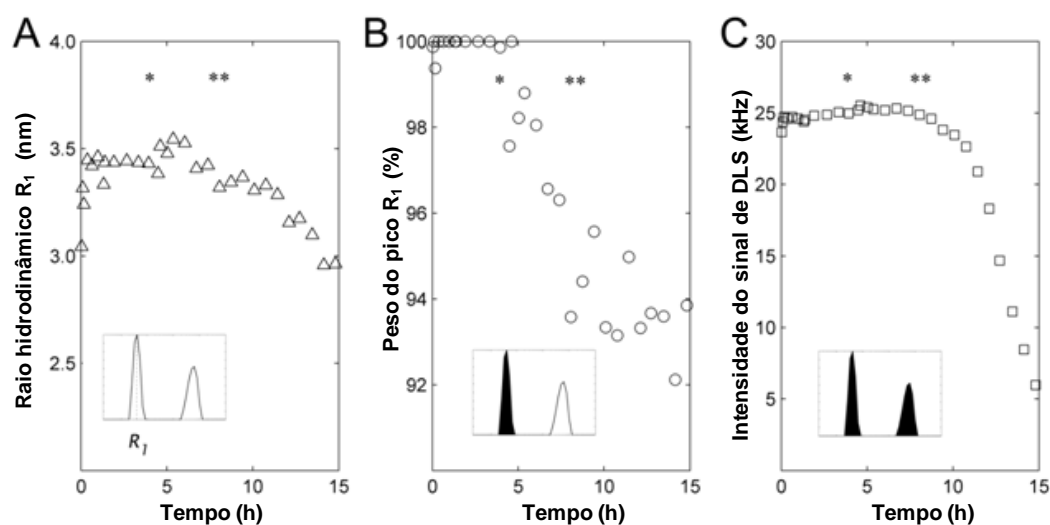


Figura 7.7: Agregação de proteínas em condições de 50 mg/mL de HEWL, 3 % (w/v) de NaCl, a pH 4.7 e 25.0 °C (sobressaturação ~ 4.5). A evolução no tempo do (A) raio hidrodinâmico médio de proteína solúvel R_1 , (B) % do pico de proteína solúvel e (C) total de luz dispersa. O asterisco indica o tempo estimado de formação de (*) aglomerados metastáveis e (**) cristais.

Os valores decrescentes do sinal de dispersão na Figura 7.7C evidenciam a formação de cristais de HEWL, que cresceram em menor número e atingiram tamanhos

médios maiores do que nas experiências realizadas a 16.0 °C. A 25.0 °C, a proteína solúvel é principalmente consumida pelo processo de crescimento cristalino dado que a intensidade de dispersão total praticamente não aumentou durante o período precedente de formação de aglomerados e diminui nitidamente após a nucleação de cristais. Esta última fase é acompanhada por uma diminuição do tamanho médio de proteína solúvel para valores de R_1 inferiores a 3 nm (Figura 7.7A), confirmando assim a incorporação preferencial de oligómeros, provavelmente octâmeros (Kovalchuk et al., 2016; Li et al., 1995), durante o crescimento cristalino. Dado o número reduzido de aglomerados mesoscópicos em solução a 25.0 °C, não é possível determinar de forma rigorosa as dimensões de R_2 e as velocidades de crescimento de aglomerados. A correspondência entre a quantidade de aglomerados em solução e o número de cristais produzidos a 16.0 °C e 25.0 °C, e o fato de a cristalização ser sempre antecedida pela formação de aglomerados metastáveis em solução estão em harmonia com anteriores observações da nucleação heterogênea de cristais de HEWL promovida por agregados metastáveis precursores (Parmar et al., 2007; Saridakis et al., 2002).

7.3.5 Possível mecanismo de cristalização intermitente

Com base nas medições das velocidades de nucleação de cristais e dinâmicas de agregação de proteínas é possível explicar o fenómeno de cristalização intermitente de proteína. A Figura 7.8 sumariza os caminhos promotores (*on-pathway*) e não promotores (*off-pathway*) que explicam a coexistência de regimes produtivos e não produtivos. Alguns dos oligómeros (círculos azuis agrupados) formados durante a primeira etapa (passo 1) irão posteriormente incorporar a estrutura cristalina, enquanto que outros participarão na nucleação e no crescimento de aglomerados metastáveis. Assim, o passo de oligomerização pode ser simultaneamente um caminho promotor e não promotor para a formação de cristais. A concentração de monómeros (círculos azuis) no momento após a formação de aglomerados metastáveis (nuvens vermelhas) determina se a nucleação heterogênea de cristais irá ou não ocorrer. Os aglomerados metastáveis atuam como nucleantes de cristais de HEWL (polígonos verdes) se a concentração de monómeros se mantiver acima do limite crítico para a nucleação heterogênea. Nestes casos, o crescimento de aglomerados (passo 4) compete com o crescimento cristalino (passo 5) por monómeros e oligómeros. É difícil definir com

rigor o valor de concentração que estabelece a transição dos dois regimes porque a variabilidade estocástica no tempo necessário para agregação de monómeros (passo 1) é continuamente amplificada pela redução de monómeros que decorre em paralelo (passo 2). E quanto mais tempo demorar a agregação, menor a probabilidade de cristalização. Em suma, a nucleação de cristais HEWL em estado não estacionário (passo 3) está dependente das etapas iniciais de oligomerização de proteína (passo 1) e de nucleação de aglomerados (passo 2). Se os passos 1 e 2 conduzirem a uma diminuição acentuada da concentração de monómeros, não são produzidos cristais de HEWL.

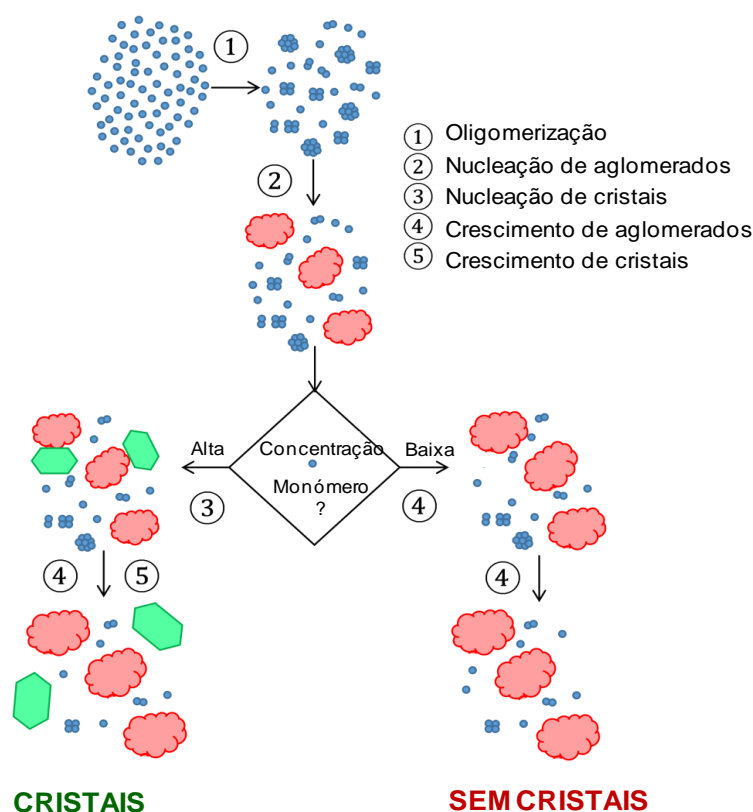


Figura 7.8: Caminhos promotores e não promotores da cristalização de HEWL.

A formação de aglomerados mesoscópicos é um processo de nucleação cujo tempo de indução (alguns minutos na Figura 7.6, e > 4 horas na Figura 7.7) parece ser dependente da sobressaturação. A posterior fase de crescimento ocorre por incorporação de proteína solúvel e não pela coalescência de agregados mais pequenos. Com tamanhos hidrodinâmicos que facilmente excedem a gama de submicrométricos (Figura 7.6A), os aglomerados metastáveis estão em permanente competição por proteína solúvel mas

também atuam como centros de nucleação heterogénea para a formação de núcleos pré cristalinos. Embora no mecanismo exemplificado na Figura 7.8 não seja considerado o papel das interfaces (ar/solução, óleo/solução, vidro/solução, e outras), sabe-se que estas favorecem a nucleação heterogénea (Martins & Rocha, 2008), variações na concentração efetiva de proteína e precipitante (García-Ruiz et al., 2016) ou a desnaturação de proteína (ver Capítulo 1). A separação líquido-líquido que ocorre a níveis de sobressaturação mais elevados (Muschol & Rosenberger, 1997; Pan et al., 2010; Vekilov & Vorontsova, 2014) está também ausente no modelo de cristalização representado na Figura 7.8.

O mecanismo de cristalização intermitente deverá ser alargado com cautela a outras proteínas que não a HEWL. Por exemplo, não é garantido que a nucleação do cristal ocorra apenas por uma agregação inicial de moléculas monoméricas, como sugerido pela inserção gráfica na Figura 7.5B. No entanto, especulou-se que as populações hétero-dispersas de proteína solúvel são mais propensas a auto agregação em aglomerados anisotrópicos do que a formar estruturas pré cristalinas muito bem ordenadas. O presente trabalho levanta também algumas questões fundamentais sobre a cristalização de proteínas: Será que as barreiras energéticas para a nucleação e crescimento são significativamente diferentes para monómeros e oligómeros? A definição de sobressaturação deveria ser alterada consoante o estado oligomérico das moléculas? Até que ponto a nucleação de cristais de proteína é heterogénea? As respostas a estas dúvidas exigem um aprofundamento do conhecimento sobre a caracterização dos perfis cinéticos associados a diferentes composições de pequenos e grandes agregados. Por agora, é importante realçar o papel crítico dos oligómeros de proteína e aglomerados metastáveis para o sucesso da etapa de cristalização em Biologia Estrutural. Visto que a concentração de espécies intermediárias *off-pathway* é influenciada notoriamente por parâmetros da solução, tais como, a concentração de proteína, força iónica e temperatura, é admissível uma mudança de paradigma na qual a busca por condições de cristalização deve ser mais direcionada para seleção racional de parâmetros biofísicos e menos dispersa por uma infinidade de possibilidades químicas. A miniaturização de fluorescência (Ericsson et al., 2006; Reinhard et al., 2013; Ristic et al., 2015) e a técnica de DLS (Bolanos-Garcia & Chayen, 2009; Dierks et al., 2008) facultam uma estratégia racional de elevada produtividade compreendendo um primeiro ciclo de seleção do melhor ambiente que favorece a estabilidade da proteína (usando,

por exemplo, corantes fluorescentes para medir o ponto médio de desnaturação) e, em seguida, um segundo ciclo procurando a concentração de proteína, precipitante/aditivo e temperatura que conduzem à formação da quantidade certa de agregados precursores de proteína. Neste respeito, estes resultados são esclarecedores sobre a correlação negativa entre a capacidade de cristalização da proteína e a poli-dispersidade da amostra (Zulauf & D'Arcy, 1992); a formação de agregados *off-pathway* reduz a quantidade de proteína solúvel e diminui as possibilidades/hipóteses de cristalização desde o início do ensaio. Também, demonstrou-se que variações no estado de oligomerização, causadas por diferentes parâmetros da solução, podem ser seguidas por DLS. Um grau de oligomerização moderado é benéfico para desencadear a sequência de eventos que conduzem à nucleação heterogênea de cristais bem diferenciados na presença de um pequeno número de aglomerados metastáveis.

7.4 Conclusões

A cristalização de proteínas é um processo pouco reprodutível (Gorrec, 2013; Luft et al., 2014, 2011; Newman et al., 2007) cujas taxas de sucesso diminuem notoriamente com o tempo (Newman et al., 2007; Ng et al., 2016). O estudo da nucleação de cristais de HEWL em estado não estacionário permitiu mostrar que a dispersão de resultados se deve à agregação *off-pathway* envolvendo a formação sequencial de oligómeros e aglomerados metastáveis. A existência de passos em paralelo foi sugerida pela influência não monotônica da concentração de HEWL nos tempos de indução e nas velocidades de nucleação do cristal. Por comparação das cinéticas de nucleação com a composição oligomérica obtida usando DLS, identificou-se uma correlação direta entre as curvas de velocidade de nucleação e a composição de monómeros de HEWL. Esta correspondência não foi afetada por diferentes velocidades de formação de aglomerados metastáveis, indicando assim que os núcleos de cristais são formados por agregação de monómeros de proteína. A análise detalhada de dados de DLS mostrou que tanto o crescimento de aglomerados como de cristais ocorrem à custa de proteína solúvel; mas a formação de aglomerados metastáveis antecedeu sempre a nucleação de cristais, e o número final de cristais estava correlacionado com a quantidade de agregados metastáveis precursores. Estas observações revelam um papel

duplo dos aglomerados metastáveis como concorrentes e nucleantes heterogêneos de cristais de proteína.

7.5 Referências bibliográficas

- Akella, S. V, Mowitz, A., Heymann, M., & Fraden, S. (2014). Emulsion-Based Technique To Measure Protein Crystal Nucleation Rates of Lysozyme. *Crystal Growth and Design*, 14, 4487–4509.
- Bolanos-Garcia, V. M., & Chayen, N. E. (2009). New directions in conventional methods of protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101(1–3), 3–12.
- Crespo, R., Villar-Alvarez, E., Taboada, P., Rocha, F. A., Damas, A. M., & Martins, P. M. (2016). What Can the Kinetics of Amyloid Fibril Formation Tell about Off-pathway Aggregation? *The Journal of Biological Chemistry*, 291, 2018–2032.
- Dierks, K., Meyer, A., Einspahr, H., & Betzel, C. (2008). Dynamic light scattering in protein crystallization droplets: Adaptations for analysis and optimization of crystallization processes. *Crystal Growth and Design*, 8(5), 1628–1634.
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N., & Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, 357(2), 289–298.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (1999). Direct Determination of the Nucleation Rates of Protein Crystals. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(49), 10965–10971.
- Galkin, O., & Vekilov, P. G. (2001). Nucleation of protein crystals : critical nuclei , phase behavior , and control pathways. *Journal of Crystal Growth*, 232, 63–76.
- García-Ruiz, J. M., Otálora, F., & García-Caballero, A. (2016). The role of mass transport in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(2), 96–104.
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*,

142(1), 22–31.

- Georgalis, Y., Schüler, J., Frank, J., Soumpasis, M. D., & Saenger, W. (1995). Protein crystallization screening through scattering techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*, 58(1), 57–86.
- Gorrec, F. (2013). The current approach to initial crystallization screening of proteins is under-sampled. *Journal of Applied Crystallography*, 46(3), 795–797.
- Ildefonso, M., Candoni, N., & Veessler, S. (2013). Heterogeneous Nucleation in Droplet-Based Nucleation Measurements. *Crystal Growth & Design*, 13, 2107–2110.
- Kovalchuk, M. V., Blagov, A. E., Dyakova, Y. A., Gruzinov, A. Y., Marchenkova, M. A., Peters, G. S., ... Volkov, V. V. (2016). Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering. *Crystal Growth and Design*, 16(4), 1792–1797.
- Li, M., Nadarajah, A., & Pusey, M. L. (1995). Modeling the growth rates of tetragonal lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth*, 156, 121–132.
- Liu, Y., Wang, X., & Ching, C. B. (2010). Toward Further Understanding of Lysozyme Crystallization: Phase Diagram, Protein–Protein Interaction, Nucleation Kinetics, and Growth Kinetics. *Crystal Growth & Design*, 10(2), 548–558.
- Luft, J. R., Newman, J., & Snell, E. H. (2014). Crystallization screening: The influence of history on current practice. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(7), 835–853.
- Luft, J. R., Wolfley, J. R., & Snell, E. H. (2011). What’s in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments. *Crystal Growth and Design*, 11(3), 651–663.
- Martins, P. M., & Rocha, F. a. (2008). Kinetic studies on the influence of temperature and growth rate history on crystal growth. *Crystal Research and Technology*, 43(12), 1258–1267.
- Muschol, M., & Rosenberger, F. (1997). Liquid – liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation /

- crystallization. *Journal of Chemical Physics*, 107(6), 1953–1962.
- Newman, J., Xu, J., & Willis, M. C. (2007). Initial evaluations of the reproducibility of vapor-diffusion crystallization. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(7), 826–832.
- Ng, J. T., Dekker, C., Reardon, P., & von Delft, F. (2016). Lessons from ten years of crystallization experiments at the SGC. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 72(2), 224–235.
- Niimura, N., Minezaki, Y., Tanaka, I., Fujiwara, S., & Ataka, M. (1999). Polar structure of lysozyme aggregates in unsaturated solution determined by small-angle neutron scattering — contrast variation method. *Journal of Crystal Growth*, 200, 265–270.
- Onuma, K., & Kanzaki, N. (2007). Multi-angle static and dynamic light scattering investigation of lysozyme association: From crystallization to liquid-liquid phase separation. *Journal of Crystal Growth*, 304(2), 452–459.
- Pan, W., Galkin, O., Filobelo, L., Nagel, R. L., & Vekilov, P. G. (2007). Metastable mesoscopic clusters in solutions of sickle-cell hemoglobin. *Biophysical Journal*, 92(1), 267–277.
- Pan, W., Vekilov, P. G., & Lubchenko, V. (2010). Origin of Anomalous Mesoscopic Phases in Protein Solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 7620–7630.
- Parmar, A. S., Gottschall, P. E., & Muschol, M. (2007). Pre-assembled clusters distort crystal nucleation kinetics in supersaturated lysozyme solutions. *Biophysical Chemistry*, 129(2–3), 224–234.
- Provencher, S. W. (1982). CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*.
- Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J., & Weiss, M. S. (2013). Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(2), 209–214.

- Ristic, M., Rosa, N., Seabrook, S. A., & Newman, J. (2015). Formulation screening by differential scanning fluorimetry: How often does it work? *Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications*, 71, 1359–1364.
- Saridakis, E., Dierks, K., Moreno, A., Dieckmann, M. W., & Chayen, N. E. (2002). Separating nucleation and growth in protein crystallization using dynamic light scattering. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58, 1597–1600.
- Schubert, R., Meyer, A., Dierks, K., Kapis, S., Reimer, R., Einspahr, H., ... Betzel, C. (2015). Reliably distinguishing protein nanocrystals from amorphous precipitate by means of depolarized dynamic light scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 48, 1476–1484.
- Silver, B. R., Fülöp, V., & Unwin, P. R. (2011). Protein crystallization at oil/water interfaces. *New Journal of Chemistry*, 35(3), 602–606.
- Tanaka, S., Ito, K., Hayakawa, R., & Ataka, M. (1999). Size and number density of precrystalline aggregates in lysozyme crystallization process. *The Journal of Chemical Physics*, 111(22), 10330–10337.
- Tyka, M. D., Keedy, D. A., André, I., Dimaio, F., Song, Y., Richardson, D. C., ... Baker, D. (2011). Alternate states of proteins revealed by detailed energy landscape mapping. *Journal of Molecular Biology*, 405(2), 607–618.
- Veesler, S., Lafferre, L., Garcia, E., Hoff, C., & Luminy, C. De. (2003). Phase Transitions in Supersaturated Drug Solution. *Organic Process Research & Development*, 7(6), 983–989.
- Vekilov, P. G. (2016). Nucleation of protein crystals. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62(2), 136–154.
- Vekilov, P. G., & Vorontsova, M. A. (2014). Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(3), 271–282.
- Vorontsova, M., Maes, D., & Vekilov, P. G. (2015). Recent advances in the

understanding of two-step nucleation of protein crystals. *Faraday Discuss.*, 179, 27–40.

Wallace, A. F., Hedges, L. O., Fernandez-martinez, A., Raiteri, P., Gale, J. D., Waychunas, G. A., ... Yoreo, J. J. De. (2013). Microscopic Evidence for Liquid-Liquid Separation in Supersaturated CaCO₃ Solutions. *Science*, 341, 885–889.

Wilson, L. J., Adcock-Downey, L., & Pusey, M. L. (1996). Monomer concentrations and dimerization constants in crystallizing lysozyme solutions by dialysis kinetics. *Biophysical Journal*, 71, 2123–2129.

Wilson, W. W. (2003). Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth—A practical approach. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 56–65.

Zulauf, M., & D’Arcy, A. (1992). Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 122, 102–106.

8 Conclusões

8.1 Apreciação geral do trabalho

O estudo da interrupção da dissolução cristais de HEWL em pequenas gotas de solução subsaturada permitiu concluir que a estabilidade conformacional da proteína pode ser comprometida por fenómenos de interface. Nas gotas de volume muito reduzido, a adsorção de proteínas na interface, e a consequente desnaturação das mesmas, são potenciadas pelos elevados valores de área superficial por unidade de volume. Após a desnaturação, as moléculas de proteína apresentam um número maior de aminoácidos disponíveis para interagir com as moléculas de solvente. Este facto contribui para o efeito de *solvation-out* que condicionou o processo de dissolução. A estabilidade é um parâmetro crucial a ter em conta na cristalização de proteínas, em especial nas proteínas difíceis de cristalizar. Este trabalho de investigação sugere otimizações aos protocolos de cristalização existentes a fim de minimizar os efeitos de fenómenos de interface (líquido/ar, líquido/óleo e líquido/líquido) na estabilidade conformacional.

A investigação de fenómenos de histerese nas velocidades de crescimento cristalino de HEWL em soluções impuras ajudou a entender o efeito das impurezas no mecanismo de crescimento. Este estudo revelou que a velocidade de variação da sobressaturação (R_σ) pode afetar significativamente o crescimento de cristais de HEWL relativamente às condições de equilíbrio. A velocidade de variação da sobressaturação pode contribuir para um efeito de envenenamento, caracterizado pelo atraso na dessorção de impurezas em *kinks*, ou para um efeito de purificação por atraso na adsorção de impurezas em *kinks*. Estes efeitos foram descritos analiticamente com base num desenvolvimento do modelo CAM, denominado modelo CAMKOD que considera a ocupação dinâmica de *kinks*. Este modelo possibilitou um melhor entendimento de comportamentos cristalinos complexos, tais como, a histerese nas velocidades de crescimento, o crescimento catastrófico ou as cinéticas de aceleração não linear das velocidades de crescimento. Além disso, o modelo pode ser aplicado a uma diversidade de sistemas cristalinos tanto orgânicos como inorgânicos. Este trabalho de investigação apresentou o modelo CAMKOD como uma ferramenta prática no controlo dos efeitos das impurezas no crescimento cristalino.

As análises por DLS realizadas a soluções proteicas em condições de nucleação remeteram para um dos fatores que diferencia a cristalização de proteína de outras moléculas mais pequenas: a composição oligomérica. A combinação dos dados de DLS com as cinéticas de nucleação elucidou para a existência de caminhos de formação de oligómeros promotores/ inibidores da nucleação de cristais de proteína. Os aglomerados metastáveis, cuja formação antecedeu sempre a nucleação de cristais, podem atuar como concorrentes ou promotores de nucleação heterogênea de cristais de proteína.

O trabalho desenvolvido propôs o desenvolvimento de estratégias racionais que assegurem maiores taxas de sucesso na cristalização de proteínas, estabelecendo condições que não só favoreçam a estabilidade de proteína mas também promovam a formação agregados precursores de proteína em quantidades ideais.

Nesta Tese, estudou-se a cinética de vários processos na cristalização de proteínas (nucleação, crescimento e dissolução) bem como os vários parâmetros que os afetam. Este projeto de investigação permitiu perceber melhor as diferenças entre a cristalização de proteínas e de moléculas pequenas, e explanou alguns fatores associados à natureza complexa da cristalização de proteínas.

8.2 Perspetivas para trabalho futuro

Uma vez terminado este estudo fundamental da cristalização de proteínas, uma outra perspetiva mais aplicada surge agora como corolário lógico deste projeto de doutoramento. Trata-se em particular da aplicação de novos métodos à cristalização de proteínas recalcitrantes, i.e., proteínas cuja estrutura tridimensional não é conhecida uma vez não ter sido ainda possível cristalizá-las em condições que permitam a análise por difração de raios-X. Há um número grande de proteínas recalcitrantes que são conhecidas por desempenhar funções vitais para a sobrevivência da célula; na lista dos exemplos mais evidentes incluem-se as proteínas membranares integrais, as proteínas intrinsecamente desordenadas, os agregados funcionais de macromoléculas e os complexos nucleotídeo-proteína. Os capítulos da Tese relativos à dissolução (Capítulo 4) e nucleação (Capítulo 7) dos cristais de proteína fornecem indicações muito concretas sobre o tipo de estratégia alternativa que deverá ser adotada nos casos das cristalizações mais difíceis. Em termos cronológicos, estes resultados foram os últimos a ser obtidos,

tendo-se revelado particularmente esclarecedores quanto às diferenças entre cristalização de moléculas pequenas e a cristalização de proteínas, e as razões pelas quais a segunda é tão mais difícil que a primeira. Estando a razão principal associada à complexidade estrutural das proteínas, o que os nossos resultados vieram possibilitar, foi a identificação de fatores chave desestabilizadores da integridade molecular, como sejam a desnaturação da proteína nas interfaces ou a formação de agregados metastáveis. Estes fatores têm sido praticamente ignorados pelos métodos *highthroughput* de procura de condições de cristalização, os quais, muitas vezes, poderão estar mesmo a promover a perda de integridade estrutural da proteína através da miniaturização excessiva dos ensaios ou pela procura indiscriminada por tentativa-erro de agentes precipitantes. Pensamos que o *know how* acumulado no nosso grupo de investigação nos últimos anos poderá ser útil integrado em projetos de colaboração em Biologia Estrutural visando a resolução dos casos mais prementes de proteínas recalcitrantes. Os métodos biofísicos que propomos envolvem, por exemplo, a escolha cuidadosa de interfaces durante a cristalização, e a seleção de condições de cristalização baseada em métodos racionais de caracterização da estabilidade conformacional (usando marcadores fluorescentes) e da composição dos agregados em solução (usando DLS). Estes métodos são de fácil implementação e perfeitamente complementares aos métodos bioquímicos atualmente em voga nos principais consórcios internacionais visando a cristalização de proteínas.

As variações na atividade termodinâmica de HEWL, observadas em ensaios de dissolução de cristais, deram mais ênfase ao papel determinante que outras macromoléculas presentes em solução poderão desempenhar nos processos biofísicos de transição de fase. Em particular, espera-se que os chamados *macromolecular crowders* possam no futuro ser tidos em conta na otimização do processo de cristalização de macromoléculas. Incentiva-se o estudo do efeito do fenómeno *macromolecular crowding* nas cinéticas de cristalização de proteínas.

Os capítulos da Parte II (relativa ao crescimento cristalino) forneceram pistas, a ser exploradas, sobre o papel determinante que as impurezas podem ter no sucesso ou insucesso da cristalização. O desenvolvimento do modelo CAM para contemplar casos de adsorção em estado não estacionário não só permitiu entender o porquê dos fenómenos de histerese e crescimento catastrófico, como também forneceu indicações sobre como potenciar ou minorar o efeito das impurezas através da variação da

sobressaturação. Neste sentido, estratégias de cristalização de proteínas envolvendo programas de variação de temperatura (e sobressaturação) que minimizam a ação de impurezas estão neste momento em estudo no nosso grupo de modo a poder ser integradas no portfólio de métodos racionais de cristalização que poderemos oferecer. Os modelos teóricos de adsorção de impurezas durante o crescimento de cristais têm um âmbito largo de aplicação que gostaríamos de estender, p.ex., a estudos de biomineralização. No início deste trabalho, um dos objetivos traçados era o estudo da cristalização de oxalato de cálcio monohidratado (COM), componente inorgânico mais predominante em cálculos renais. O estudo dos mecanismos subjacentes à formação de cristais de COM é importante para a compreensão da etiologia da urolitíase. Contudo, contingências na realização do plano de trabalhos e os novos caminhos que entretanto foram sendo abertos impossibilitaram o cumprimento deste objetivo. Após a finalização da Tese, seria interessante investigar e entender os mecanismos que impedem o crescimento de cristais de COM. Na instalação experimental desenvolvida para acompanhamento de cinéticas de crescimento de cristais de HEWL chegaram a ser realizados ensaios de crescimento cristalino de COM na presença de aditivos. A análise preliminar destes resultados facultou desde logo informações importantes sobre a atuação de possíveis inibidores deste tipo de biomineralização patológica. Foi ainda usada a técnica de microscopia de força atômica para caracterizar o efeito destes inibidores na morfologia dos cristais de COM. É desejável que este estudo possa ser completado num futuro próximo.

Anexo - A

Derivação matemática do modelo de adsorção competitiva compreendendo a ocupação dinâmica de kink (CAMKOD)

No Capítulo 5, a definição de θ_l como o quociente entre o número de *kinks* ocupados com impurezas n_i e o número total de locais de *kinks* n_T foi o ponto de partida para obter a equação em estado não estacionário para o fator de eficácia de impureza β :

$$\frac{R_\sigma}{k_{-i}} \cdot \frac{d\beta}{d\sigma} = \beta_e - \beta \left(1 + \frac{R_\sigma}{k_{-i}} \phi \right) \quad (\text{A.1})$$

onde β_e é a constante de equilíbrio da ocupação de *kinks*, k_{-i} é a constante de velocidade de desprendimento, R_σ é a velocidade de variação de sobressaturação (σ), e

$$\phi = \frac{d\ln(n_T)}{d\sigma} + \frac{d\ln(\theta_s)}{d\sigma} \quad (\text{A.2})$$

Assumiu-se que adsorção à superfície das impurezas é suficientemente rápida para garantir valores de cobertura da superfície θ_s em estado estacionário. Assim, o valor de θ_s num dado instante é dado diretamente a partir da isotérmica de adsorção competitiva (Martins et al., 2011):

$$\theta_s = \frac{K_i c_i}{K_i c_i + K\sigma + 1} \quad (\text{A.3})$$

A concentração de impurezas constante c_i , esta equação é reescrita como:

$$\theta_s = \frac{K'_1}{K_2 + \sigma} \quad (\text{A.4})$$

onde K'_1 e K_2 são combinações das constantes de *Langmuir* K_i e K , e de c_i :

$$K'_1 = \frac{K_i c_i}{K} \quad (\text{A.5})$$

$$K_2 = \frac{K_i c_i + 1}{K} \quad (\text{A.6})$$

Desta forma, a definição do parâmetro ϕ dado pela equação A.2 é desenvolvido tendo em conta a equação A.3 e que a variação de n_T com σ segue uma distribuição do tipo *Boltzman*:

$$\phi = \left(\frac{\varepsilon}{k_B T \sigma} \right)^2 - \frac{1}{K_2 + \sigma} \quad (\text{A.7})$$

Com ε sendo uma constante relacionada com a energia de ativação para a formação de hillocks, e $k_B T$ é o produto de constante de *Boltzmann* e da temperatura (Martins & Rocha, 2007; Ohara & Reid, 1973). Uma solução exata de variação de θ_l com σ em estado não estacionário pode ser obtida após a substituição de β na equação A.1 definida por:

$$\beta = \frac{\theta_l}{\theta_s} \quad (\text{A.8})$$

E adotando diferentes os valores de ϕ na equação A.7 consoante a densidade de *kinks* seja independente de σ - ($\phi < 0$) ou dependente de σ ($\phi > 0$):

I. Densidade de *kinks* independente de σ ($\phi < 0$)

Neste caso de densidade de *kinks* independente de σ , o termo ao quadrado na equação A.7 é nulo. A equação diferencial ordinária (EDO) que define a variação de θ_l

em estado não estacionário é então obtida a partir da equação A.1, após a substituição das definições de β , θ_s e ϕ dadas pelas equações A.8, A.4 e pela forma simplificada de equação A.7, respetivamente:

$$\frac{R_\sigma}{k_{-i}} \cdot \frac{d\theta_l}{d\sigma} = \frac{K_1}{K_2 + \sigma} - \theta_l \quad (\text{A.9})$$

onde $K_1 = \beta_e K'_1$ e o termo $K_1/(K_2 + \sigma)$ correspondem à cobertura de locais ativos em equilíbrio θ_e . Recorrendo ao programa Maple, a equação diferencial ordinária foi resolvida assumindo a condição inicial $\theta_l(\sigma_0) = \theta_0$. Diferentes soluções são apresentadas de acordo com a direção da variação de σ . Para $R_\sigma > 0$,

$$\begin{aligned} \theta_{l+} = \theta_0 \exp[-k_R(\sigma - \sigma_0)] + k_R K_1 \exp[-k_R(\sigma + K_2)] & (E_i[k_R(\sigma + K_2)] \\ & - E_i[k_R(\sigma_0 + K_2)]) \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

e para $R_\sigma < 0$,

$$\begin{aligned} \theta_{l-} = \theta_1 \exp[k_R(\sigma - \sigma_1)] + k_R K_1 \exp[k_R(\sigma + K_2)] & (E_1[k_R(\sigma + K_2)] \\ & - E_1[k_R(\sigma_1 + K_2)]) \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

onde k_R é dada pela razão $|k_{-i}/R_\sigma|$, E_1 e E_i são funções integrais exponenciais definidas no eixo real positivo como se segue (Abramowitz & Stegun, 1964):

$$E_1(x) = \int_x^\infty \frac{\exp(-t)}{t} dt \quad (\text{A.12})$$

$$E_i(x) = \int_{-\infty}^x \frac{\exp(t)}{t} dt \quad (\text{A.13})$$

II. Densidade de *kinks* dependente de σ ($\phi > 0$)

No caso da densidade de *kinks* dependente σ , a seguinte EDO resulta da substituição das equações A.7, A.8 e A.4 na equação A.1:

$$\frac{R_\sigma}{k_{-i}} \cdot \frac{d\theta_l}{d\sigma} = \beta_e \theta_s - \theta_l \left(1 + \frac{R_\sigma}{k_{-i}} \left(\frac{\varepsilon}{k_B T} \right)^2 \frac{1}{\sigma^2} \right) \quad (\text{A.14})$$

Quando o efeito de impurezas em estado estacionário é desprezável, $\beta_e \theta_s \approx 0$, e a anterior equação pode ser resolvida sujeita à condição inicial $\theta_l(\sigma_0) = \theta_0$, para obter:

$$\theta_{l\pm} = \theta_0 \left[\mp k_R (\sigma - \sigma_0) + \left(\frac{\varepsilon}{k_B T} \right)^2 \left(\frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\sigma_0} \right) \right] \quad (\text{A.15})$$

Onde o sinal subscrito indica aumento (+) ou diminuição (−) σ .

Referências bibliográficas

- Abramowitz, M., & Stegun, I. A. (1964). *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*. U.S.: Department of Commerce.
- Martins, P. M., & Rocha, F. (2007). Characterization of crystal growth using a spiral nucleation model. *Surface Science*, 601(16), 3400–3408.
- Martins, P. M., Rocha, F., Damas, A. M., & Rein, P. (2011). Unsteady-state inhibition of crystal growth caused by solution impurities. *CrystEngComm*, 13, 1103–1110.
- Ohara, M., & Reid, R. C. (1973). *Modelling Crystal Growth Rates from solution*. New Jersey: Prentice- Hall.